

Aus der Fachrichtung 2.5, Biophysik der medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Bedeutung von N-Glykosylierungsmotiven für die Funktion des speichergesteuerten Calcium Einstroms

Role of N-glycosylation motifs for the function of store operated calcium entry

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2012

vorgelegt von: **Tatiana Kilch**

geb. am: **28. Mai 1984 in Neunkirchen/Saar**

Homburg, Mai 2012

Abkürzungsverzeichnis

2-ABP	-	2- Aminoethoxydiphenylborat
AG	-	Antigen
APC	-	antigen presenting cell
		Antigen präsentierende Zelle
ARC	-	arachidonate regulatet Calcium
ATP	-	Adenosintriphosphat
BAPTA	-	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
BSA	-	bovine serum albumine
		Rinderserum
Ca ²⁺	-	Calcium
CAD	-	CRAC activating domain
		CRAC aktivierende Domäne
cADPR	-	zyklische ADP Ribose
CCD	-	chargecoupled device
CD	-	current density
		Stromdichte
CDG	-	congenital disorder of glycosylation
CICR	-	Calcium induced Calcium release
		calciuminduzierte Calciumfreisetzung
CPVT		catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia
CRAC	-	Calcium release activated Calcium
DAG	-	Diacylglycerol
DEPC	-	Diethylpyrocarbonat
d.h.	-	das heißt
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DTT	-	Dithiothreitol
EGTA	-	ethylene glycol tetraacetic acid
ER	-	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	-	fetal calf serum
		fötales Kälberserum
FRET		Försters/Fluoreszenz Resonanz Energietransfer
Fura 2AM	-	Fura-2 Acetoxymethylester
g		mittlere Erdschwerebeschleunigung
GFP	-	green fluorescent protein
		grün fluoreszierendes Protein
HA	-	Haemagglutinin
HEDTA	-	N-hydroxyethyl-ethylenediamine-triacetic acid
HEK	-	Human embryonic kidney (cells)
		Humane embryonale Nierenzellen
I _{CRAC}	-	Calcium release-activated calcium current
IS	-	Immunologische Synapse

IP ₃	-	Inositol-1,4,5-triphosphat
KO	-	Knockout
LGCC	-	ligand gated non- specific cation channels ligandengesteuerte Kationenkanäle
LRS	-	Leukozytenreduktionskammer
MSCC	-	mechanosensitive Calcium- entry channels mechanosensitive Calciumkanäle
NaCl	-	Natriumchlorid
NCKX	-	Na ⁺ / Ca ²⁺ - K ⁺ - exchanger Natrium- Calcium- Kalium- Austauscher
NCX	-	Na ⁺ /Ca ²⁺ - exchanger Natrium- Calcium- Austauscher
nsRNA	-	non silencing ribonucleic acid
OST	-	Oligosaccharyltransferase
PBMC	-	peripheral blood monocyte Periphere Monozyten aus Vollblut
PBS	-	phosphate buffered saline Phosphat gepufferte Salzlösung
PLC γ	-	Phospholipase C γ
PCR	-	Polymerase chain reaction Polymerasekettenreaktion
pH	-	pondus Hydrogenii
PIP ₂	-	Phosphatidylinositol 4,5- Bisphosphat
PM	-	Plasmamembran
RACC	-	receptor activated calcium channels rezeptoraktivierte Calciumkanäle
RFP	-	red fluorescent protein rot fluoreszierendes Protein
ROC	-	receptor operated channel
ROI	-	region of interest Region von Interesse
ROS	-	reactive oxygen species reaktive Sauerstoffspezies
RT	-	Raumtemperatur
rpm	-	rounds per minute Umrundungen pro Minute
RyR	-	Ryanodinrezeptor
SCID	-	Severe combined immuno deficiency
sem	-	standard error of the mean
SERCA	-	Sarcoplasmatische/Endoplasmische Retikulum Calcium ATPase
SDS	-	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	-	silencing ribonucleic acid
SIDS	-	sudden infant death syndrome

		Plötzlicher Kindstod
SOCE	-	Store-operated calcium entry speichergesteuerter Calciumeinstrom
SR	-	Sarkoplasmatisches Retikulum
STIM	-	Stromal interaction molecule
SLE	-	systemischer Lupus erythematodes
SCD		sudden cardiac death Plötzlicher Herztod
TBE	-	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBP	-	TATA- Box Bindeprotein
TBS	-	TRIS-gepufferte Saline
Tg	-	Thapsigargin
TIRF	-	total internal reflection microscopy
TRP	-	transient receptor potential
TM	-	Transmembrandomäne
u.a.		unter anderem
UPR	-	Unfolded protein response
VOCC	-	voltage operated calcium channels spannungsabhängige Calciumkanäle
WT	-	Wildtyp
YFP	-	yellow fluorescent protein gelb fluoreszierendes Protein
z.B.	-	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	10
2 Summary.....	12
3 Einleitung.....	14
3.1 Mobilisierung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern.....	15
3.2 Calciumeinstrom über die Plasmamembran.....	15
3.3 Der Calcium release activated Calcium current (I_{CRAC})	17
3.3.1 Die Orai Proteine.....	19
3.3.2 Die STIM Proteine	20
3.4 Das Zusammenspiel von STIM1 und Orai1	21
3.5 SOCE und die Immunantwort	22
3.6 Die N- Glykosylierung	23
3.7 Zielsetzung der Arbeit.....	24
4 Material.....	26
4.1 Chemikalien.....	26
4.2 Reaktions-Kits	26
4.3 Zubehör	26
4.4 Geräte	26
4.5 Zellkulturmedien und Puffer	28
4.6 Größenstandards	29
4.7 DNA-Plasmide	29
4.8 Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme.....	29
4.9 Antikörper	29
4.10 Antibiotika.....	30
4.11 Kompetente Zellen für die Klonierung.....	30
4.12 DNA-Konstrukte	30
4.12.1 Orai Konstrukte	30
4.12.2 STIM1 Konstrukte.....	31
4.12.3 Sonstige Konstrukte.....	32
4.12.4 qRT-PCR Primer	32
4.12.5 Sequenzierungs-Primer für Vektorplasmide	33
4.13 siRNA	33

5 Methoden	34
5.1 Zellkultur	34
5.1.1 Verwendete Zelllinien	34
5.1.2 Isolation von CD4 ⁺ T-Zellen aus humanem Vollblut	34
5.1.3 Vorbehandlung der Zellen	35
5.2 Transiente Transfektion	36
5.3 Immunhistochemische Färbung und Fluoreszenzaufnahmen mit dem Zeiss Cell Observer	36
5.4 Biochemische Methoden	37
5.4.1 Herstellung von Proteinlysaten	37
5.4.2 Proteinbestimmung (BCA, Bicinchoninic acid reaction)	38
5.4.3 SDS-Gel Elektrophorese	38
5.4.4 Western Blot Analysen	40
5.4.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen mit Hilfe der „enhanced chemiluminescence reaction“ (ECL-Reaktion)	41
5.4.6 Redetektion	41
5.4.7 Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP)	42
5.4.8 Detektion von membranständigen Proteinen mit Hilfe der Biotinylierung	42
5.5 Rekombinante DNA Technologien	43
5.5.1 Polymerase Ketten Reaktion (PCR; polymerase chain reaction)	43
5.5.2 Quick change site directed mutagenesis PCR	45
5.5.3 Kolonie-PCR	46
5.5.4 qRT-PCR (Quantitative Reverse Transkriptase-PCR)	47
5.5.5 Umklonierung	50
5.5.6 Agarose Gelelektrophorese	51
5.5.7 Gelextraktion	52
5.5.8 Herstellung von chemisch kompetenten <i>E.coli</i> Zellen	52
5.5.9 Hitzeschocktransformation von Plasmiden in chemisch kompetente Bakterienzellen	53
5.5.10 Isolierung von Plasmid DNA	53
5.5.11 Sequenzierung	54
5.6 Fura 2AM-basierende Calciumkonzentrationsbestimmungen	54
5.7 TIRF-Mikroskopie (Total internal reflection fluorescence- Mikroskopie)	59
5.8 Förster Resonanzenergietransfer (FRET)	60
5.9 Elektrophysiologie: Patch-clamp	63

5.9.1	Das Rampen-Protokoll	65
5.9.2	Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit (open probability P_o)	67
5.9.3	Bestimmung der Einzelkanalleitfähigkeit durch nicht-stationäre Rauschanalyse (Noise Analysis)	67
5.10	Software	70
6	Ergebnisse	72
6.1	Tunicamycin verstärkt SOCE und I_{CRAC} in Jurkat T-Zellen	72
6.2	Die STIM1 N131D N171Q glykosylierungsdefiziente Mutante verändert den Orai1 vermittelten Calciumstrom	74
6.3	Die STIM1N131DN171Q- Supermutante	77
6.4	STIM1DQ reduziert die Orai1 Proteinkonzentration	79
6.5	Der STIM1DQ Effekt tritt bereits sechs Stunden nach Transfektion auf	81
6.6	Das STIM1WT Protein kann die Effekte von STIM1DQ nicht imitieren	83
6.7	STIM1DQ weist eine schnellere Aktivierungskinetik auf	85
6.8	Kann plasmamembranständiges STIM1DQ den Orai1 vermittelten Calciumstrom beeinflussen?	88
6.9	Die Interaktion von STIM1DQ mit Orai1 ist nicht verändert	91
6.10	STIM1DQ amplifiziert den Orai2 vermittelten, aber nicht den Orai3 vermittelten Calciumstrom	95
6.11	Pharmakologisches Profil mit 2-APB	97
6.12	Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse	98
6.13	Wie kommt die Reduktion der Orai1 Proteinkonzentration nach Kotransfektion mit STIM1DQ zustande?	99
6.14	Die Orai1 N223A glykosylierungsdefiziente Mutante vermittelt Wildtyp- ähnliche Calciumsignale in HEK293 Zellen	108
6.15	Die Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1 (ST6-Gal1) beeinflusst die Funktionalität von STIM1 und Orai1 nicht	109
6.16	Effekte von Neuraminidasen und Klotho auf SOCE in primären $CD4^+$ T Zellen	111
6.17	Ein Modell um die CRAC Kanal Aktivierung durch STIM1DQ beschreiben zu können	122
7	Diskussion	125
7.1	Bedeutung der Glykosylierung von Oberflächenproteinen für die Calciumsignale in T-Zellen	125
7.2	Die glykosylierungsdefizienten Orai1- und STIM1 Mutanten	126
7.3	Regulation der Orai1 und STIM1 Proteinmenge	129

8 Anhang	131
8.1 Literaturverzeichnis.....	131
8.2 Unbedenklichkeitserklärung der Ethikkommission	144
8.3 Eidesstattliche Erklärung.....	144
8.4 Danksagungen	145
8.5 Curriculum vitae	146

1 Zusammenfassung

Calcium (Ca^{2+}) ist ein universelles Signalmolekül, das eine wichtige Rolle in vielen zellulären Prozessen wie z.B. Erregbarkeit, Transkription, Exozytose und Apoptose spielt. In den meisten Immunzellen ist der Hauptmechanismus zur Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration der so genannte speichergesteuerte Calciueinstrom (store operated Ca^{2+} entry, SOCE). Der in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisierte Ca^{2+} Sensor STIM1 (stromal interaction molecule 1) bindet und aktiviert die in der Plasmamembran (PM) lokalisierten Orai1 Ionenkanäle. STIM1 ist also direkt am Calciueinstrommechanismus, der wichtig für eine einwandfreie Funktionalität von Immunzellen ist, beteiligt. Das Verhältnis von STIM1 zu Orai1 bestimmt die Effizienz des Calciueinstroms und damit die Ca^{2+} -abhängigen zellulären Funktionen. Veränderungen in der Quantität und der Qualität von Proteinglykosylierungen spielen eine wichtige Rolle in der Immunzellentwicklung und -funktion. Daher wird in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Glykosylierung auf Calciumsignale im Allgemeinen und auf CRAC (calcium release activated calcium) im Speziellen untersucht. Tatsächlich erhöht eine Inhibierung von Oligosaccharyltransferasen mit Tunicamycin SOCE in Jurkat T Zellen. Zuckermodifizierende Enzyme wie Sialidasen oder Klotho sind allerdings nicht in der Lage SOCE in primären humanen CD4^+ T-Zellen zu beeinflussen. Die zwei Schlüsselkomponenten von SOCE, STIM1 und Orai1, sind beide N-glykosylierte Proteine. Das Orai1 Protein hat eine Glykosylierungsstelle an der Aminosäure N223. Für STIM1 wurden zwei N-Glykosylierungsstellen innerhalb der EF-SAM Domäne am N-Term des Proteins gezeigt, die in vivo auch durch Glykane modifiziert sind. Um den individuellen Beitrag von STIM1 und/oder Orai1 am Tunicamycin Effekt zu erfassen, haben wir die potentiellen Glykosylierungsstellen in beiden Proteinen mutiert. Die Mutation der NVS Konsensussequenz im Orai1 Protein führt zu keiner Veränderung des speichergesteuerten Calciueinstroms in HEK293 Zellen. Ein konventioneller Austausch der Konsensus Aminosäure Asparagin durch Glutamin im STIM1 Protein (N/Q) führt zu einer Reduktion des Orai1 vermittelten Calciumstroms. Andere Aminosäuresubstitutionen an den gleichen Stellen induzieren variable Veränderungen in der Stromdichte mit einer Mutation, die den STIM1 induzierten CRAC Strom deutlich vergrößert. Die STIM1N131DN171Q (STIM1DQ) Mutante erhöht den Calciumstrom etwa um das vierfache. Interessanterweise kann diese Mutation im STIM1 Protein mit einer Proteinreduktion von Orai1 korreliert werden und führt wahrscheinlich deshalb zu einer Verschiebung des STIM1:Orai1 Proteinverhältnisses hin zu optimaleren Werten. Untersuchungen mit der nicht funktionellen Orai1R91W Mutante weisen auf eine Aktivitäts- bzw. Calcium-abhängige Regulierung der Orai1 Proteinkonzentration hin. Die vorliegenden Daten lassen die Annahme zu, dass die Caspase- induzierte Proteindegradation eine entscheidende Rolle bei dem Prozess spielen könnte. Trotz einer reduzierten Orai Proteinmenge zeigen Untersuchungen mittels nicht-stationärer Noise-Analyse, dass in Verbindung mit STIM1DQ insgesamt mehr Orai1 Kanäle aktiviert sind. Der Phänotyp der STIM1DQ Mutante kann durch eine Veränderung des STIM1WT zu Orai1WT Proteinverhältnisses nur teilweise imitiert werden. Die Stromdichte wird mit zunehmender STIM1WT Menge zwar zunächst größer, erreicht allerdings niemals die Werte des STIM1DQ induzierten Stroms, was für einen zusätzlichen Effekt der Mutation auf die Stabilität oder Funktionalität der EF-SAM Domäne spricht. Die Ergebnisse von TIRF Experimenten unterstützen diese Annahme. Das STIM1DQ Protein clustert und aktiviert den Orai1

vermittelten Calciumstrom deutlich schneller. Der Zusammenhang zwischen der STIM1 EF-SAM Domäne und dem STIM1 Clustering und der Orai1 Aktivierung wurden in der Literatur bereits beschrieben. Die aktuellen Daten lassen darauf schließen, dass die STIM1DQ Mutante schneller clustert und dadurch den Orai1 Kanal effizienter aktivieren kann. Die fehlende Glykosylierung an sich scheint nicht die Ursache der veränderten Proteineigenschaften zu sein. Viel mehr scheint es ein Effekt der Konformationsänderung zu sein, die mit der Abwesenheit der großen Zuckerketten einhergeht. Die vorliegende Arbeit weist den engen Zusammenhang zwischen Glykosylierung, Struktur und Funktion von STIM1 Proteinen auf. Zudem wurde ein neues mathematisches Modell entwickelt, um die Effekte veränderter STIM1:Orai1 Verhältnisse und veränderter Diffusion auf I_{CRAC} und SOCE zu beschreiben. Die Regulation der Orai1 Proteinstabilität durch seinen Aktivator STIM1 weist einen neuen Regulationsmechanismus für den speichergesteuerten Calciumstrom auf.

2 Summary

Ca^{2+} is an ubiquitous signaling messenger and plays an essential role in many cellular functions such as excitability, transcription, exocytosis and apoptosis. In most immune cells the predominant mechanism to raise the intracellular Ca^{2+} concentration is the store-operated Ca^{2+} entry (SOCE). The endoplasmic reticulum (ER) Ca^{2+} sensor stromal interaction molecule 1 (STIM1) binds and activates plasma membrane localized Orai1 channels, providing a Ca^{2+} influx pathway that is essential for proper immune cell function. Careful titration of the protein concentration of STIM1 and Orai1 thus determines the amount of Ca^{2+} influx and its subsequent downstream effects. Because changes in the degree and quality of glycosylation can also affect immune cell development and function, we investigated the impact of altered glycosylation on SOCE. Indeed, inhibition of oligosaccharyltransferases with Tunicamycin increased SOCE in Jurkat T cells. Enzymes which just modify the sugar residues, e.g. by removing terminal sialic acids, like Sialidase or Klotho don't affect SOCE in primary human CD4^+ T cells. The two key players of SOCE, STIM1 and Orai1, are both N-glycosylated proteins. Orai1 has one glycosylation site at amino acid position N223. STIM1 has been shown to contain two N-linked glycosylation sites within the EF-SAM domain at the N-terminus of the protein that are both modified by glycans in vivo. To delineate the contribution of Orai1 and STIM1, we mutated their potential N-glycosylation sites. The mutation of the consensus NVS site into IVI in the Orai1 protein causes no change in store-operated Ca^{2+} entry and Calcium release activated current (CRAC) characteristics. However, conventional replacement of the consensus asparagines by glutamines in STIM1 (N/Q) led to a reduction in Orai1 mediated currents. Other amino acid substitutions at the same positions led to variable degrees of current modification with one mutation leading to significantly increased current sizes. The STIM1N131DN171Q (STIM1DQ) mutant increases the Orai1 mediated current 4 fold. Interestingly, this mutation correlated with a decrease in Orai1 protein concentration and likely led to a change in the STIM1:Orai1 stoichiometry towards an optimized ratio for Orai1 activation. We made effort to identify the mechanism of the Orai1 protein rundown after cotransfection with STIM1DQ. Orai1 degradation is largely prevented in non-functional Orai1R91W mutants, pointing towards activity-dependent regulation of Orai1 protein stability. The current data indicate a role of the caspase induced protein cleavage. Non stationary noise analyses of Orai1 mediated current revealed an increase in the number of active channels, with just little change in open probability or single channel conductance. The phenotype of the mutant could only be partially mimicked by alteration of wildtype protein ratios between Orai1 and STIM1. Current density increases with rising amount of STIM1WT but never reaches the level of the STIM1DQ mediated current, suggesting an additional influence of the mutation on the EF-SAM domain stability or function. TIRF data support this idea. STIM1DQ clusters faster and activates the Orai1 mediated current significantly faster. The correlation between the STIM1 EF-SAM domain stability and the STIM1 clustering and Orai1 activation has been shown previously. Our current data suggest that our gain-of-function STIM1DQ mutant clusters faster and may activate the Orai1 channel more efficiently. This doesn't seem to be a direct effect of the loss of glycosylation but more a conformational change which comes along with the absence of the sugar trees. This work shows the tight relationship between glycosylation, structure and function of STIM1 proteins. We describe also a new mathematical model to delineate effects of

altered STIM1:Orai1 stoichiometry and altered diffusional parameters. Regulation of Orai1 protein stability by its activator STIM1 adds an important aspect in the regulation of SOCE.

3 Einleitung

Unser Universum dehnt sich ständig aus und diese Ausdehnung begann bereits vor etwa 15 Milliarden Jahren mit dem heißen Urknall. Die Nukleogenese beschäftigt sich mit der Entstehung der Elemente und zeigt, dass bereits drei Minuten nach dem Urknall die ersten Elemente Wasserstoff, Helium und Lithium als so genannte Elemente kosmologischen Ursprungs geboren waren. Alle anderen Elemente im heutigen Universum werden in den Sternen „gekocht“. So auch das Element Calcium, welches während einer Supernova, der Explosion eines Sterns, entsteht.

Calciumsalze wurden erstmal im Jahr 1755 von dem Schotten Joseph Black beschrieben, wobei die erste Reindarstellung den Chemikern Bunsen und Matthiesen im Jahr 1857 gelang. Seitdem wurde Calcium (Ca^{2+}) als rein strukturbildendes Element in Knochen und Zähnen beschrieben, bis die Experimente des britischen Mediziners und Pharmakologen Sydney Ringer um 1880 dieses Wissen revolutionierten. In seinen ersten Experimenten hatte Ringer isolierte Rattenherzen in eine Kochsalzlösung aufgenommen, für deren Herstellung er Londoner Leitungswasser von hoher Härte verwendete. Die Herzkontraktionen waren dauerhaft und deutlich zu erkennen. Als er in weiteren Experimenten das Leitungswasser durch destilliertes Wasser ersetzte, machte Ringer die Beobachtung, dass die Kontraktionen zunehmend schwächer wurden und nach etwa 20 Minuten aufhörten. Er fand heraus, dass zur Aufrechterhaltung der Kontraktionen die Zugabe von Calciumsalzen erforderlich war. Auf diesem Weg wurde erstmals gezeigt, dass Calcium, das ursprünglich als rein strukturbildendes Element angesehen wurde, physiologische Aktivität in einem Gewebe zeigte, das weder mit Knochen noch mit Zähnen in Zusammenhang steht (Carafoli, 2002; Morgulis & Gies, 1914). Zu den weiteren Wegbereitern auf dem Gebiet der Calciumforschung gehörte der amerikanische Biologe Lewis Victor Heilbrunn. Er entdeckte im Jahr 1940, dass Ca^{2+} in isolierte Muskelfasern des Frosches diffundieren kann und dort Kontraktionen auslöst. Nachdem die biochemische, biophysikalische und strukturelle Basis der Muskelkontraktion von Szent-Gyorgyi, sowie Hanson und Huxley bereits in den 40-er und 50-er Jahren aufgeklärt wurde, blieb dennoch die Frage offen, wie die Kopplung zwischen Nervenimpuls und Kontraktion abläuft. Der japanische Physiologe Ebashi Setsurō entdeckte, dass in der Abwesenheit von Ca^{2+} keine Kontraktionen stattfinden konnten, auch nicht, wenn er ATP zu Aktin- und Myosinfilamenten gab. Nach Zugabe von Ca^{2+} jedoch bildete sich eine starke Kontraktion aus (Endo, 2006). Die Idee von Ca^{2+} als second messenger wurde ab diesem Zeitpunkt intensiv untersucht und beforscht.

David E. Clapham schrieb: „Calciumsignaling affects every aspect of a cell's life and death. The most tightly regulated ion within all membrane-bound organisms, Calcium binds to thousands of proteins to effect changes in localization, association and function“. Heute weiß man, dass Ca^{2+} eine zentrale Rolle in fast allen Prozessen im Leben einer Zelle spielt, angefangen bei der Entstehung bis hin zum Sterben einer Zelle. Calciumsignale regulieren Abläufe wie z.B. die Signaltransduktion, die Zellproliferation, die Motilität, die Transkription, die Exocytose und die Apoptose (Clapham, 2007). Lange Zeit blieb die Frage unbeantwortet, wie ein einziges Ion es schaffen kann eine Vielzahl so unterschiedlicher Prozesse simultan zu regulieren bzw. zu beeinflussen. Die Antwort liegt in der Vielseitigkeit der Signale in Bezug auf Geschwindigkeit, Amplitude und zeitlich-räumliches Auftreten der veränderten Calciumionenkonzentration (Berridge et al, 2000). Jede Zelle muss daher ständig sehr viel Energie aufbringen, um Ionenkonzentrationsgradienten für Signalwege aufzubauen und aufrecht zu erhalten. In diesem Prozess wirken eine Vielzahl verschiedener

Kanäle, Pumpen, Uniporter und Organellen mit. Unter Basalbedingungen beträgt die intrazelluläre Calciumionenkonzentration im Cytosol etwa 100 – 200 nM. Je nach Zellart und Stimulus kann diese bei Aktivierung bis zu 1 μ M ansteigen und diverse Prozesse in Gang setzen (Feske, 2007). Verfügbare Quellen für Calciumionen stellen zum einen das Endoplasmatische Retikulum (ER) und in den Muskelzellen entsprechend das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) mit einer Calciumionenkonzentration von 0,5 mM und der Extrazellulärraum mit einer Calciumionenkonzentration von etwa ein bis drei mM dar (Feske, 2007). Auch die Mitochondrien, als Ca^{2+} speichernde Organellen, leisten hierzu einen wichtigen Beitrag (Quintana et al, 2011).

3.1 Mobilisierung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern

Der Calciumausstrom aus den internen Calciumspeichern wird durch eine Vielzahl von Kanälen gesteuert, von denen die Familien der Inositol- 1,4,5- Trisphosphat Rezeptoren (IP_3R) und Ryanodin Rezeptoren (RyR) am besten untersucht und charakterisiert sind. Der prinzipielle Aktivator dieser Kanäle ist Ca^{2+} selbst, in einem Prozess, den man als Ca^{2+} induzierte Ca^{2+} Freisetzung (CICR Calcium induced Calcium release) bezeichnet. Allerdings kann Ca^{2+} alleine die Kanäle nicht aktivieren. Für die Aktivierung von IP_3R ist zusätzlich die Anwesenheit des sekundären Botenstoffs Inositol 1, 4, 5-Triphosphat (IP_3) notwendig. Die Aktivität der RyR wird zusätzlich durch den second messenger zyklische ADP Ribose (cADPR) reguliert (Berridge, 1993, Berridge et al, 2000, Mak et al, 1999). Insgesamt gibt es 3 Homologe (IP_3R Typ 1, IP_3R Typ 2, IP_3R Typ 3) des IP_3R die homo- und heterotetramere Kanäle bilden können. Der IP_3R Typ 1 ist am weitesten verbreitet und wird in allen Geweben und in allen Entwicklungsstufen gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass die IP_3R verschiedenste Rollen während der Entwicklung, bei Prozessen wie der frühen Embryogenese spielen und, dass der Verlust der Funktion dieser Kanäle zu schwerwiegenden Phänotypen führt (Mikoshiba, 2011; Kimlicka & Van Petegem, 2011). Auch von dem RyR gibt es drei Subtypen, deren Expressionmuster gewebe- und zellspezifisch verschieden sind. Am häufigsten sind die RyR in Skelettmuskel- und Herzmuskelzellen zu finden, wo sie an der Übersetzung des Nervenimpulses in eine Kontraktion entscheidend beteiligt sind (Kimlicka & Van Petegem, 2011). In einer neuen Studie wurde der RyR Typ 2 mit dem plötzlichen Kindstod (sudden infant death syndrome SIDS) und plötzlichen Herztod (sudden cardiac death, SCD) in Verbindung gebracht (Larsen et al, 2012). Durch die enorm wichtige Funktion in Herzmuskelzellen kann eine Dysregulation zunächst die Ausbildung einer Tachykardie (catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, CPVT) begünstigen, die dann zum SCD führen kann.

3.2 Calciumeinstrom über die Plasmamembran

Wie bereits erwähnt, sind der Aufbau und die Aufrechterhaltung von Ionengradienten über Membranen eine Grundvoraussetzung für die Signaltransduktion. Im Falle des Ca^{2+} besteht ein steiler Konzentrationsgradient über die Plasmamembran (PM) und die ER Membran, da das Cytosol mit einer durchschnittlichen Calciumionenkonzentration von etwa 100 – 200 nM ca. 10.000 fach unter der des extrazellulären Milieus mit 1-3 mM und der des ER mit etwa 500 μ M liegt. Der Konzentrationsgradient über die Membranen wird durch Ca^{2+} Pumpen in der Plasmamembran (plasma membrane Calcium-pump, PMCA) und im Endoplasmatischen bzw. Sarkoplasmatischen Retikulum (sarco-endoplasmic Calcium-ATPase, SERCA), sowie durch Natrium-Calcium-Austauscher

($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger, NCX) bzw. Natrium-Calcium-Kalium-Austauscher ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -exchanger, NCKX) aufrecht erhalten. Die PMCA's haben eine hohe Affinität für Ca^{2+} , aber eine geringe Kapazität, während die Austauscher (NCX, NCKX) eine geringe Affinität für die entsprechenden Ionen, aber eine hohe Kapazität aufweisen (Clapham, 2007). Dafür liegen die SERCA's in extrem hoher Dichte von etwa 2000 pro μm^2 vor und können daher extrem effizient das cytoplasmatische Ca^{2+} absenken (Means et al, 2006). Neben der chemischen Triebkraft, ausgelöst durch den Konzentrationsgradienten, besteht auch eine starke elektrische Triebkraft für den Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle. Aufgrund des negativen inneren Plasmamembranpotentials, das in vielen ruhenden Zelltypen bei ~ -60 mV liegt, resultiert eine große Triebkraft für den passiven Eintritt von Ca^{2+} nach Depolarisation oder Rezeptor-vermittelter Stimulation der Zelle (Berridge, 1993). Abbildung 1 zeigt übersichtlich das Zusammenspiel von Kanälen, Rezeptorkanälen und Transportern bei der Einstellung und Aufrechterhaltung eines Calciumionenkonzentrationsgradienten und die Abläufe bei Aktivierung der PM-ständigen Kanäle.

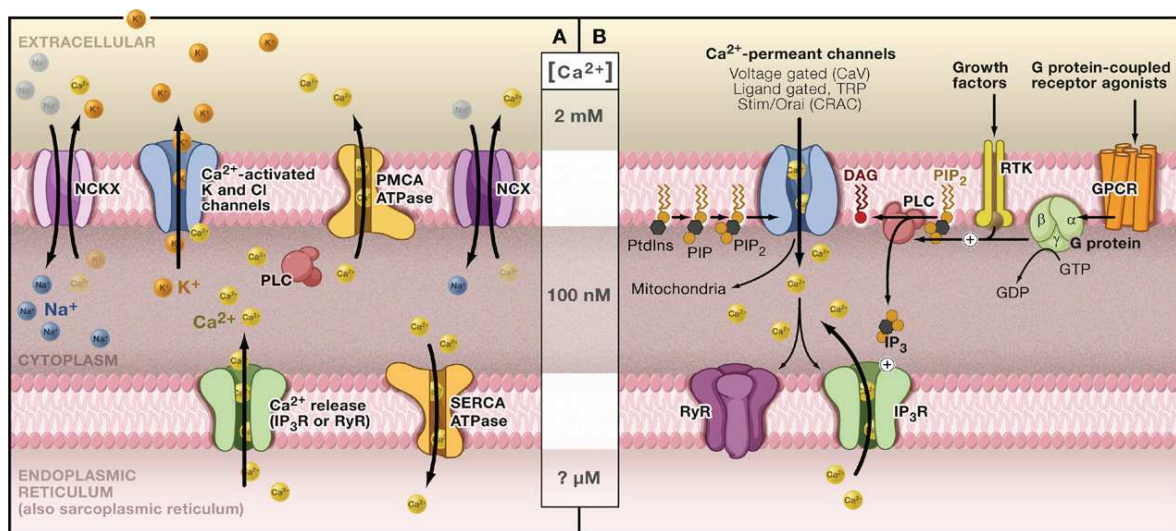


Abbildung 1: Aufrechterhaltung und Nutzung von Ca^{2+} -Konzentrationsgradienten für Signalkaskaden (Abbildung aus Clapham, 2007). A Die cytoplasmatische Calciumionenkonzentration in ruhenden Zellen ist relativ niedrig und wird durch die Aktivität der Calcium-ATPasen in Plasmamembran (PMCA) und ER (SERCA) auf einem Level von ungefähr 100 nM gehalten. Der Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) transportiert drei Na^+ gegen ein Ca^{2+} . B Ionenkanäle in der Plasmamembran öffnen durch Verschiebung des Membranpotentials oder Bindung von intrazellulären bzw. extrazellulären Liganden. Wenn diese Kanäle öffnen, fließen ungefähr 1×10^6 Ionen pro Sekunde pro Kanal in die Zelle. Diese initiale Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration führt zur Freisetzung von weiteren Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern via Aktivierung von Ryanodinrezeptoren (RyR). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) bzw. Rezeptor-Tyrosinkinasen vermitteln nach Aktivierung die Spaltung von Phosphatidylinositol Bisphosphat (PIP₂) in Inositol-1, 4, 5 -Triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) durch die Phospholipase C (PLC). IP₃ ist der Ligand an Inositol-1, 4, 5-Triphosphat-Rezeptoren (IP₃R) in der ER-Membran.

Der Hauptcalciumeinstrom über die Plasmamembran erfolgt im Wesentlichen durch vier verschiedene Kanalproteintypen, die nach ihrem Aktivierungsmechanismus in verschiedene Gruppen unterteilt werden. In elektrisch erregbaren Zellen, wie Nerven-, Muskel- oder endokrinen Zellen, vermitteln hoch selektive spannungsabhängige Calciumkanäle (VOCC) in Folge einer Depolarisierung der Plasmamembran den Calciumeinstrom in das Zellinnere. Zu den ligandengesteuerten Kationenkanälen (LGCC) zählen u.a. Neurotransmitter-Rezeptoren, wie Serotoninrezeptoren (5-HT₃), nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor (nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs) und N-Acetyl-D-

Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren). Die rezeptoraktivierten Calciumkanäle (RACC) sind als Plasmamembran-Kanäle definiert, die indirekt nach Bindung eines Agonisten, wie z.B. Hormone oder Wachstumsfaktoren, an ihre jeweiligen Rezeptoren geöffnet werden, wobei das Rezeptorprotein vom Kanalprotein getrennt ist und der Öffnungsmechanismus keine Depolarisation der Plasmamembran erfordert. Bei dieser Gruppe wird im Hinblick auf den Aktivierungsmechanismus wieder zwischen receptor operated channel (ROC) und store operated channel (SOC) unterschieden. Der Calciuminflux durch RACCs wurde sowohl in elektrisch erregbaren, als auch in elektrisch nicht erregbaren Zellen nachgewiesen (Clapham, 1995, Fasolato et al, 1994, Parekh et al, 1997, Putney & Bird, 1993). Die Existenz von Ionenkanälen, die sensitiv für mechanische Stimuli sind (MSCC), wurde bereits für viele Zelltypen nachgewiesen. Die Aktivität der mechano-sensitiven Kanäle ist für die Signaltransduktion vieler unterschiedlicher Prozesse, wie z.B. Hören, Fühlen oder Zellbewegung durch Kontraktion glatter Muskelzellen, entscheidend (Zou et al, 2002).

3.3 Der Calcium release activated Calcium current (I_{CRAC})

Bereits im Jahr 1986 beschrieb James Putney einen Calciumeinstrom in Zellen, der nach Entleerung der intrazellulären Speicher mit IP_3 ausgelöst wurde. Hoth et al. charakterisierten diesen Calciumstrom über die PM elektrophysiologisch und nannten ihn I_{CRAC} für calcium release activated calcium current. Ein heute ebenfalls weit verbreiteter Name ist speicheraktivierter Calciumeinstrom (store operated Ca^{2+} entry SOCE), wobei der Begriff SOCE für den Calciumeinstrom nach Speicherentleerung in Imagingexperimenten und I_{CRAC} für den Calciumstrom explizit durch den Orai1 Kanal in Patch-clamp Experimenten verwendet wird.

I_{CRAC} kann durch die Entleerung des ER mit IP_3 , dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin oder einem Ca^{2+} -Chelator wie z.B. EGTA ausgelöst werden und dient u.a. dazu die intrazellulären Speicher nach Entleerung wieder mit Ca^{2+} aufzufüllen. Der Kanal wird durch einen Feedbackmechanismus den man als calciumabhängige Inaktivierung bezeichnet (Ca^{2+} dependent inactivation) durch Ca^{2+} selbst inhibiert (Zweifach & Lewis, 1995; Derler et al, 2009, Mullins et al, 2009). Der CRAC Strom ist nicht spannungsaktiviert, stark einwärts rektifizierend und hoch selektiv für Ca^{2+} . Das Umkehrpotential liegt bei etwa +50 mV (Hoth & Penner, 1992). Erst unter vollständig divalentfreien Bedingungen (DVF) leitet der CRAC Kanal in hohem Maß monovalente Ionen wie z.B. Na^+ (Cahalan 1996, Bakowski D, Parekh AB. 2002). Der Calciumstrom durch den CRAC Kanal kann u.a. durch 2-APB (2-aminoethoxydiphenylborat) (Bakowski et al, 2001; Peinelt et al, 2008a) und durch dreiwertige Lanthan- und Gadoliniumionen blockiert werden (Hermosura et al, 2002, Hoth & Penner, 1992).

Obwohl dieser speicheraktivierte Calciumstrom in vielen experimentellen Studien in verschiedenen Zellsystemen sehr gut charakterisiert war, blieben die molekularen Komponenten viele Jahre unbekannt. Dies änderte sich in den Jahren 2005 und 2006, als durch genomweite siRNA Screens das Calciumsensorprotein STIM1 (Liou et al, 2005, Roos et al, 2005) und das Orai1 Protein, als eigentliches Kanalprotein (Feske et al, 2006; Prakriya et al, 2006, Vig et al, 2006, Zhang et al, 2006), identifiziert werden konnten. Peinelt et al zeigten 2006, dass nach Überexpression von STIM1 und Orai1 die Stromdichte 60-fach vergrößert war. Diese Experimente ließen den Schluss zu, dass beide Proteine molekulare Komponenten von I_{CRAC} sind. Das Verhältnis von STIM1 zu Orai1 spielt hier eine sehr entscheidende Rolle für die Eigenschaften des Orai1 vermittelten Calciumstroms. Li et al

und Lewis et al konnten zeigen, dass 8 STIM1 Moleküle notwendig sind um einen Orai1 Kanal, bestehend aus 4 Untereinheiten, optimal zu aktivieren (Li et al, 2011; Hoover & Lewis, 2011). Der Aktivierungsmechanismus des CRAC Stroms ist in Abbildung 2 am Beispiel einer T-Zelle dargestellt, die durch eine Antigen präsentierende Zelle (antigen presenting cell APC) aktiviert wird.

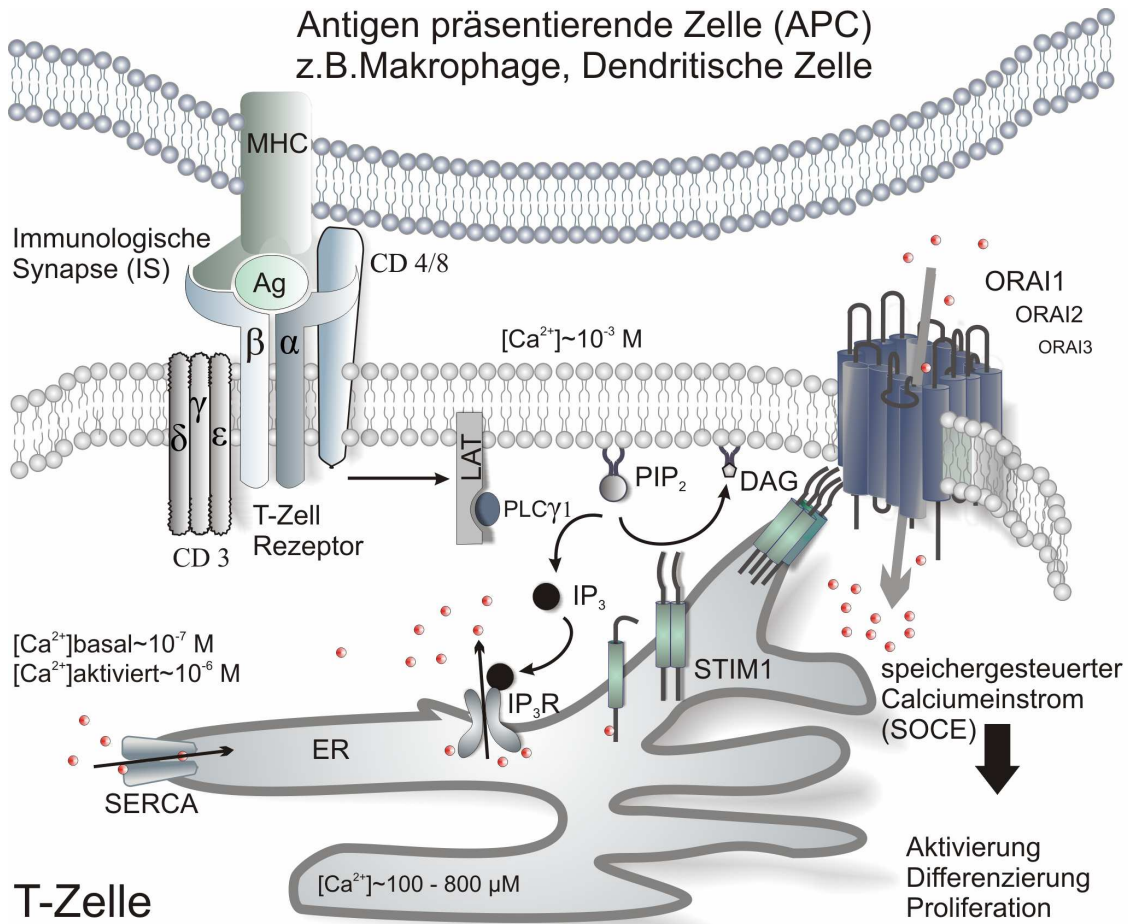


Abbildung 2: Aktivierungsmechanismus des speicheraktivierten Calciueinstroms durch den Orai1 Kanal. Trifft eine T-Zelle eine antigenpräsentierende Zelle (APC) so bildet sich über den MHC (major histability complex) Komplex mit dem Antigen (AG) und den T-Zell Rezeptor mit kostimulatorischen Rezeptoren (CD3, CD4/8) die so genannte Immunologische Synapse (IS) aus. Die PLC γ wird durch Phosphorylierung aktiviert und spaltet PIP₂ in DAG und IP₃. IP₃ bindet an den IP₃R in der ER Membran und führt so zur Speicherentleerung. Das STIM1 Molekül verliert das gebundene Ca²⁺ und verändert die Struktur. Dadurch aggregieren die STIM1 Monomere zu Dimeren und diffundieren in PM nahe Regionen um dort durch direkte Interaktion den Orai Kanal in der PM zu aktivieren. Ca²⁺ kann aus dem extrazellulären Raum in das Cytosol einströmen und Prozesse wie T-Zellaktivierung, Differenzierung oder Proliferation in Gang setzen. Die ATP betriebene Calciumpumpe SERCA in der Membran des ER füllt den Calciumspeicher wieder auf.

Nach Ausbildung der immunologischen Synapse (IS) werden Tyrosinkinasen aktiv, die dann die Phospholipase C γ (PLC γ) phosphorylieren und somit aktivieren. Dieses Enzym spaltet das Phospholipid Phosphatidylinositol- 4,5- Bisphosphat (PIP₂) in die Produkte Diacylglycerol (DAG) und Inositol 1, 4, 5-Triphosphat (IP₃). IP₃ bindet an den IP₃R in der ER Membran und führt damit zur Entleerung des intrazellulären Calciumspeichers. Das an die erste EF-Hand gebundene Ca²⁺ des STIM1 Moleküls dissoziiert und STIM1 Monomere aggregieren zu Oligomeren. Diese STIM1 Oligomere diffundieren durch die ER Membran in PM nahe Bereiche, wo sie zu Multime-

ren zusammenclustern und den in der PM lokalisierten Orai1 Kanal durch direkte Interaktion (Park et al, 2009, Zhou et al, 2010; Soboloff et al, 2011) öffnen können.

Der speichergesteuerte Calciumeinstrom, und die damit verbundene Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration, aktiviert kurz- und langfristige Antworten in Immunzellen. Der Anstieg der Calciumionenkonzentration führt direkt z.B. zur Mastzelldegranulation oder zum Abtöten von virusinfizierten oder entarteten Zellen durch die CD8⁺ Killerzellen. Langfristig ergeben sich Veränderungen in der Transkription von Genen, die zur Proliferation und Differenzierung von B- und T- Zellen führen. Die Übersetzung der erhöhten Calciumionenkonzentration in veränderte Transkriptionsevents obliegt u.a. dem Transkriptionsfaktor nuclear factor of activated T cells (NFAT). Dieser liegt im inaktiven Zustand stark phosphoryliert im Cytoplasma vor und wird nach Aktivierung dephosphoryliert und kann dann in den Zellkern eingeschleust werden, wo er Transkriptionsevents beeinflussen kann. Hierdurch werden verschiedene Signalwege in Gang gesetzt, die letztendlich zur Aktivierung, Differenzierung oder Proliferation der T Zellen führen (Gwack et al, 2007a).

Mittlerweile wurden CRAC Ströme auch in vielen anderen primären Zellsystemen neben den T-Zellen untersucht, hierzu zählen z.B. das Nervensystem (Ohana et al, 2009), das glatte Muskelgewebe (Yang et al, 2011), die Haut (Stanisz et al, 2012) und vor allem die Zellen des menschlichen Immunsystems (Cahalan & Chandy, 2009, Oh-hora, 2009, Thakur & Fomina, 2011, Yarkoni & Cambier, 2011). Es wurde gezeigt, dass der speicherregulierte Calciumstrom eine wichtige Rolle für die Zellteilung (Golovina et al, 2001), die Proliferation (Gill et al, 1996), die Genexpression (Enfissi et al, 2004), die Zelldifferenzierung (Wu et al, 2004), die Apoptose (Blackshaw et al, 2000, Flourakis et al, 2010, Vanden Abeele et al, 2003) und die Exocytose (Parekh & Putney, 2005) spielt.

3.3.1 Die Orai Proteine

Der Orai1 Kanal als molekulare Komponente des speicherinduzierten Calciumstrom wurde im Jahr 2006 unabhängig von drei verschiedenen Gruppen in genomweiten siRNA Screens identifiziert . Der Name Orai entstammt der griechischen Mythologie und steht hier für die Wächter der Himmelsportalen (Feske et al, 2006). Das Gen ist beim Menschen auf Chromosom 12q24 lokalisiert. Im menschlichen Genom hat man 3 homologe Orai Gene gefunden, Orai1-3 (CRACM1-3) (Gwack et al, 2007b). Die drei Orai Homologe zeigen spezifische Selektivität für Ca²⁺ Ionen, verschiedenes pharmakologisches Verhalten nach 2-APB Applikation und unterschiedliches Verhalten bei der Calcium- abhängigen Inaktivierung des Kanals (Lis et al, 2007). Ein aktiver Orai Kanal wird aus 4 Orai Proteinen gebildet und dieser kann homo- oder heteromer aufgebaut sein. Das Orai Protein ist in der PM lokalisiert und besitzt vier Transmembrandomänen, wobei der C- und der N-Term im Cytoplasma lokalisiert sind (Soboloff et al, 2006). Die Bedeutsamkeit des Orai Proteins wird in so genannten SCID (severe combined immune deficiency) Patienten deutlich. Diese Patienten haben kein funktionstüchtiges Immunsystem, was bei einigen Patienten durch eine einzelne Punktmutation im Orai1 Gen hervorgerufen wird. Ein einzelner Nukleotidaustausch von Cytosin zu Thymin an Position 271 in der kodierenden Region des Orai1 Gens führt zur Ausbildung der Aminosäure Tryptophan anstelle von Arginin (R91W). Der CRAC Strom in diesen Zellen bleibt aus und eine adäquate Aktivierung von T-Zellen ist so nicht möglich (Feske et al, 2006). Desweiteren wurde die Bedeutung des Orai1 vermittelten Calciumstroms in Orai1 Knockout Mäusen sichtbar. Diese sind

sehr viel kleiner als die Wildtyp Mäuse, leiden an Augenlidreizungen und sporadischem Haarausfall. Obwohl die B- und T- Zellentwicklung normal abläuft weisen die B-Zellen einen verminderten Calciumeinstrom nach B-Zellrezeptor Stimulation auf. Auch die T-Zellen zeigen verminderten CRAC Strom und reduzierte Cytokinproduktion. Der Phänotyp dieser Mäuse ist vergleichbar mit dem von SCID Patienten, die die Mutation im Orai1 Gen tragen (Gwack et al, 2008).

3.3.2 Die STIM Proteine

STIM steht für stromal interaction molecule und wurde bereits im Jahr 1996 von Oritani et al. entdeckt. Allerdings brachte man das Protein damals noch nicht mit dem speicheraktivierten Calciumstrom in Verbindung, sondern handelte das STIM Gen als mögliches Tumorsuppressorgen (Williams et al, 2001). Die Korrelation zwischen STIM und CRAC/SOCE entstand erst knapp zehn Jahre später, als zwei verschiedene Gruppen durch genomweite siRNA Screens das STIM1 Molekül als molekulare Komponente des CRAC Stroms identifizierten (Liou et al, 2005, Roos et al, 2005). Es gibt zwei homologe STIM Proteine, welche durch unterschiedliche Gene kodiert werden: STIM1 und STIM2. Im humanen Genom ist das STIM1 Gen auf Chromosom 11p15.5 und das STIM2 Gen auf Chromosom 4p15.1 lokalisiert. Beide Proteine teilen 61 % Sequenzhomologie, besitzen eine Transmembrandomäne und sind in der Membran des ER lokalisiert. Im Lumen des ER besitzen sie zwei Calciumbindemotive (EF-Hände), von denen allerdings nur die erste Domäne wirklich Calcium bindet und so STIM zum Calciumsensor des ER Calciumionengehalts macht. Wird das ER entleert, so verliert das STIM Molekül das gebundene Ca^{2+} , aggregiert in so genannte Punctae und diffundiert durch die Membran in PM nahe Regionen um dort den Orai Kanal zu aktivieren. Punktmutationen in der Calciumbindedomäne des STIM Proteins führen dazu, dass das Protein, unabhängig von der Calciumionenkonzentration innerhalb des ER, geclustert vorliegt und den Calciuminflux durch den Orai Kanal konstitutiv antreibt (Liou et al, 2005).

Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass das STIM1 Protein in sehr geringem Maße auch in der PM lokalisiert ist (Zhang et al, 2005). Die Bedeutung von PM lokalisiertem STIM ist allerdings noch weitgehend unbekannt. Es wird vermutet, dass STIM1 dort bei der Adhäsion oder der ARC- (arachidonate regulatet calcium) Kanal Aktivierung eine Rolle spielt (Cahalan, 2009, Mignen et al, 2007, Shuttleworth et al, 2007, Shuttleworth, 2012).

Passend zu dem weitläufigen Expressionsmuster von STIM1 und der nachgewiesenen Bedeutung für SOCE hat der Knockout von STIM1 weitreichende Folgen. Obwohl die Embryogenese zunächst normal verläuft, versterben die Mäuse noch im Uterus oder kurz nach der Geburt. Auch STIM2 KO Mäuse sterben in der Regel im Alter von vier bis fünf Wochen (Cahalan, 2009). Auch im Menschen wurden bereits mehrere Immundefiziensyndrome mit einer Nonsense Mutation in STIM1 in Verbindung gebracht (Feske, 2011). In den Fibroblasten eines Patienten konnte kein SOCE mehr nachgewiesen werden und der Patient litt an einem komplexen Syndrom kombinierter Immundefizienz mit Infekten und Autoimmunreaktionen (Picard et al, 2009).

3.4 Das Zusammenspiel von STIM1 und Orai1

Das in der ER Membran lokalisierte STIM Protein ist der molekulare ER Calciumsensor, welcher Calciumsignale und Calciumhomöostase reguliert. Im aktivierten Zustand sind die STIM Moleküle hoch dynamische Kommunikatoren, die kleinste Verringerungen in der Calciumionenkonzentration wahrnehmen und durch Aktivierung des Orai Kanals in der PM wieder ausgleichen. Die Arbeitsgruppe um Mitsuhiro Ikura konnte die Struktur der EF-SAM Domäne im STIM1 Molekül aufklären und trug somit zum Verständnis der Vorgänge nach Aktivierung bei. Mutationen in der EF-SAM Domäne des STIM1 Moleküls äußerten sich darin, dass die STIM1 Proteine unabhängig von der Calciumionenkonzentration aggregiert waren und den Orai Kanal konstitutiv aktivierten (Zheng et al, 2011).

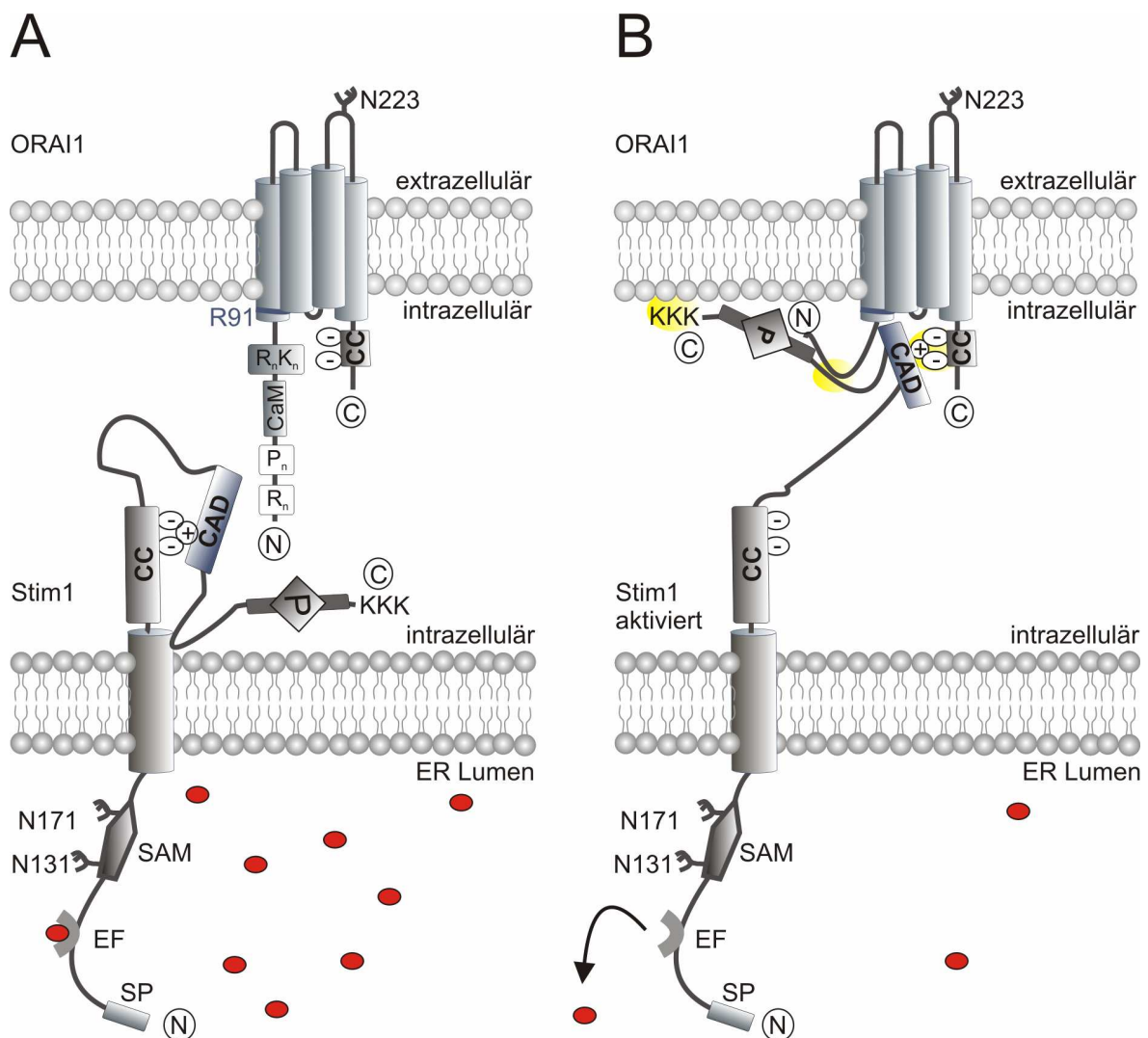


Abbildung 3: Die STIM1 Aktivierung führt zur Konformationsänderung und Interaktion mit dem Orai1 Kanal. A Im nicht aktivierten Zustand hat die EF-Hand des STIM1 Moleküls Ca²⁺ gebunden und die coiled-coil Domänen am C-Term des Proteins sind durch intramolekulare, elektrostatische Kräfte dicht gepackt. B Nach Aktivierung des STIM1 Moleküls durch Erniedrigung der Calciumionenkonzentration im ER, oxidativen Stress oder Temperaturschwankungen entfaltet sich der C-Terminus von STIM1 und interagiert mit und aktiviert den Orai1 Kanal in der PM.

Solange Ca²⁺ gebunden ist, bildet die EF-SAM Domäne am N-Term des Proteins eine dicht gepackte Struktur. Sobald Ca²⁺ dissoziiert, wird diese Domäne destabilisiert, entfaltet sich und be-

wirkt das Clustering der STIM1 Moleküle. Diese strukturelle Veränderung des N-Terms wird auch auf den C-Terminus des Proteins übertragen. Hier werden inhibitorische, intramolekulare elektrostatische Interaktionen zwischen der ersten coiled coil Domäne und der CAD (CRAC activating domain) Domäne reduziert und der dicht gepackte C-Term wird entfaltet, so dass ein basischer Bereich des Proteins innerhalb der CAD Domäne exponiert wird und an saure Aminosäuren im Orai C-Term binden kann (Kim & Muallem, 2011). Es wurde bereits gezeigt, dass die CAD Domäne (Aminosäuren 342-448) alleine ausreicht, um den Orai Kanal adäquat zu aktivieren (Park et al, 2009). Das STIM1 Molekül hat drei Zielbereiche an die es bindet. Mit dem basischen Bereich innerhalb der CAD Domäne bindet es an den sauren Bereich des Orai1 C-Terms. Mit einer noch nicht identifizierten Stelle interagiert das Molekül wahrscheinlich zudem mit dem N-Terminus des Kanals und mit dem lysinreichen, polybasischen C-Terminus interagiert STIM1 mit sauren Phospholipiden in der PM (siehe Abbildung 3).

Der funktionelle Orai1 Kanal wird aus 4 Orai1 Untereinheiten gebildet und optimal durch die Bindung von 8 STIM1 Molekülen aktiviert (Hoover & Lewis, 2011). Das Verhältnis von STIM1 zu Orai1 Molekülen spielt eine entscheidende Rolle für die Eigenschaften des CRAC Stroms (Scrimgeour et al, 2009). Das Expressionsmuster von STIM1 und Orai1 stellt somit ein Regulationsmechanismus für SOCE und I_{CRAC} dar. In primären T- und B-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass sich das STIM1:Orai1 Verhältnis unterscheidet, so die Höhe des Calciumeinstroms moduliert und an den jeweiligen Bedarf anpasst (Yarkoni & Cambier, 2011). Ein weiteres Beispiel dieses Regulationsmechanismus lies sich in Cardiomyocyten zeigen. In neonatalen Cardiomyocyten lässt sich die STIM1 mRNA und das STIM1 Protein nachweisen, die Menge der mRNA und des Proteins nehmen mit zunehmender Entwicklung der Zellen jedoch ab, so dass in den adulten Zellen keine Transkripte oder Proteine von STIM1 mehr nachzuweisen sind. Induziert man allerdings mit Phenylephrin eine Hypertrophie in den Zellen, so wird das STIM1 Protein wieder gebildet, der Calciumeinstrom in den Zellen erhöht und somit der Calcineurin-NFAT Pathway verstärkt, der bei der Ausbildung einer cardialen Hypertrophie eine entscheidende Rolle spielt (Luo et al, 2012a).

3.5 SOCE und die Immunantwort

Das Immunsystem ist das biologische Abwehrsystem, das den Körper höherer Lebewesen vor potentiell pathogenen Erregern schützt, indem es körperfremde, infizierte und entartete Zellen erkennt und eliminiert. Zu den zellulären Bestandteilen des humanen Immunsystems zählen die Granulozyten, die Monozyten, die dendritischen Zellen, die Makrophagen, die natürlichen Killerzellen, die T-Lymphozyten, die $CD4^+$ T-Helferzellen, die $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen und die B-Zellen. Damit diese Zellen ihre spezifischen Aufgaben erfüllen können, müssen sie zunächst stimuliert werden, was zu einer Veränderung der intrazellulären Calciumionenkonzentration und anschließend zur Aktivierung verschiedenster Signalwege führt. Die Aktivierung der Zellen erfolgt über Rezeptoren wie z.B. den T- oder B-Zellrezeptor. Der vorrangige Signalweg um die intrazelluläre Calciumionenkonzentration in Lymphozyten zu erhöhen, ist der speicheraktivierte Calciumeinstrom durch den CRAC Kanal. In T-Zellen, die defizient für den speichergesteuerten Calciuminflux sind, zeigt sich eine reduzierte Interleukinproduktion, eingeschränkte T-Zellproliferation und eine verminderte T-Zell bedingte Immunantwort (Feske, 2007), was die Bedeutung der CRAC vermittelten Calciumsignale für die Immunantwort unterstreicht. Die Calciumsignale in Lymphozyten werden in kurz- und langanhaltende Signale unterteilt. Während die kurzzeitigen Calciumerhöhungen für die Moti-

lität, die Ausbildung der immunologischen Synapse (IS) und den Killingprozess wichtig sind, spielen die langanhaltenden Calciumionenkonzentrationsveränderungen bei der Genexpression (z.B. für Cytokine) eine entscheidende Rolle. Die Länge und Dauer der erhöhten Calciumionenkonzentration kodieren die Ca^{2+} - abhängigen Expressionsmuster.

Sind die Calciumsignale aus unterschiedlichen Gründen in Lymphozyten verändert oder beeinflusst, so kann es zu verschiedenen Erkrankungen kommen. Das Brutus Syndrom (XLA, Agammaglobulinämie) z.B., zeichnet sich durch fehlerhafte B-Zellentwicklung aus. Durch eine Mutation in einer nicht Rezeptor Tyrosinkinase wird die PLC γ nicht adäquat aktiviert und so ist SOCE beeinträchtigt. Die Patienten leiden unter erhöhter Infektanfälligkeit. Auch diverse Autoimmunerkrankungen werden mit fehlerhaften Calciumsignalen in Lymphozyten in Verbindung gebracht. So weisen die B-Zellen von Patienten mit systemischer Lupus erythematoses (SLE) veränderte B-Zellrezeptor vermittelte Signale und damit erhöhte Calciumsignale auf. Autoreaktive T-Zellen spielen bei Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose und Typ 1 Diabetes eine Rolle. Weitere physiologische und pathophysiologische Änderungen in der Lymphozytenfunktion wurden im Alterungsprozess und bei Krebserkrankungen gefunden. Die Hintergründe sind noch nicht aufgedeckt, allerdings vermutet man, dass Veränderungen des Glykosylierungsgrades und -musters der Lymphozytenproteine einen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit haben könnten (Marth & Grewal, 2008). Da viele Immunrezeptoren komplexe Glykosylierungsmuster aufweisen, könnte man sich vorstellen, dass eine veränderte Glykosylierung über ein verändertes Calciumsignal zur veränderten Funktion führen könnte.

3.6 Die N- Glykosylierung

Die N- Glykosylierung gehört zu den posttranslationalen Proteinmodifikationen und ist ein Prozess, der von der Hefe bis hin zum Menschen evolutionär konserviert ist. Die N-Glykosylierung startet am rauen ER. Die Ribosomen dort leiten das naszierende Protein durch den Sec61 Kanal in das Lumen des ER, wo Oligosaccharlytransferasen (OST) den Transfer von vorgefertigten Oligosacchariden auf das Protein katalysieren. Die Anheftung erfolgt an den Amid-Stickstoff des Asparagins (N) der Konsensus Sequenz Asn-x-Thr/Ser, wobei x für jede beliebige Aminosäure außer Prolin stehen kann. Die lipidaktivierten Zucker Dolichol-Phosphat-Mannose (Dol-P-Man) und Dolichol-Phosphat-Glucose (Dol-P-Glc) dienen für weitere Prozessierungsschritte im ER als Zuckerdonor. Noch während sich das Protein im ER in seine korrekte Struktur faltet, werden durch die Glucosidasen I und II drei Glukosereste und ein Manosserest von der Zuckerkette abgespalten. Anschließend kann der Transfer des Proteins mittels Transpotvesikeln in den Golgi-Apparat erfolgen, wo weitere Modifikationen der Zuckerketten in Form von Trimming- und Elongationsschritten mit weiteren Zuckerresten (N-Acetylglucosamin, Galaktose, Fucose, Sialinsäure) stattfinden, bis das fertige, komplex glykosylierte Protein gebildet ist. Je nachdem welchen Bestimmungsort Proteine haben (ER, Zytoplasma oder PM), so werden diese Proteine unterschiedlich glykosyliert. Man unterscheidet deshalb mannosereiche glykosylierte Proteine, wie z.B. STIM1, die im ER bleiben und hauptsächlich aus Mannosezuckern bestehen und komplex glykosylierte Proteine, wie z.B. Orai1, die im Golgi-Apparat weiter modifiziert werden. Die Golgi alpha-Mannosidase II spaltet Mannosereste der Zuckerketten ab, so dass eine Kernstruktur zurück bleibt, die man in allen komplexen Oligosacchariden finden kann. Durch diesen Vorgang wird die Bindung zwischen den N-Acetylglucosaminresten stabil gegenüber der Endoglykosidase Endo H. Bei diesem Enzym handelt

es sich um eine Endoglycosidase isoliert aus *Streptomyces plicatus* oder *Streptomyces griseus*. Deshalb wird das Enzym Endo H häufig eingesetzt um mannosereiche von komplexen Proteinglykosylierungen zu unterscheiden.

Fehlerbehaftete N-Glykosylierung kann zu den verschiedenen Ausprägungen des CDG Syndroms (congenital disorder of glycosylation) führen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die N-Glykosylierung sehr wichtig für die Struktur und die korrekte Faltung von Proteinen ist (Helenius & Aebi, 2001). Auch die Oberflächenexpression bestimmter Proteine wurde mit der Glykosylierung in Verbindung gebracht (Ray et al, 1998).

3.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Proteinglykosylierung kann die Struktur und Funktion von Proteinen durch sterische Einflüsse, zusammen mit inter- und intramolekularen Interaktionen, beeinflussen und hat damit eine wichtige biologische Funktion in der Proteinentwicklung und dem Turnover, der Zelladhäsion und dem Trafficking, der Rezeptorbindung und –aktivierung. Durch diese vielseitigen Einflüsse spielt die Proteinglykosylierung eine wichtige Rolle für die Funktionalität des Immunsystems. Die Entwicklung und Funktion des Immunsystems sind mit Umstrukturierungen im zellulären Glycom verbunden. Das Immunzell-Glycom wird während Prozessen, wie z.B. der Differenzierung, Aktivierung oder Apoptose, verändert und angepasst. Das Glykosylierungsprofil verschiedener Proteine ist ausschlaggebend für Prozesse wie z.B. Ausbildung der immunologischen Toleranz, Immunzellendifferenzierung und T-Zell Entwicklung (Marth & Grewal, 2008).

Es gibt Evidenzen, dass die altersbedingte Abnahme der T-Zellfunktion, und damit der gesamten Immunfunktion, von dem Glykosylierungsstatus von PM ständigen Proteinen auf den T-Zellen abhängt. Berger et al. (Berger et al, 2006) zeigten eine Aufhebung altersbedingter Defekte in der Aktivierung von T-Zellen alter Mäuse nach Behandlung mit dem Enzym O-sialoglycoprotein endopeptidase (OSGE), welches die Zuckerketten von O-glykosylierten Proteinen schneidet. So liegt die Vermutung nahe, dass der altersbedingte Rückgang der T-Zellfunktion, d.h. die Immunseneszenz, unter anderem durch eine Hyperglykosylierung von Oberflächenproteinen auf den Zellen zustande kommt. Neuere Arbeiten zeigen nun, dass auch Enzyme wie PNGaseF und ST-Siase(2,3) aus *Salmonella typhimurium*, die beide N-verknüpfte Zuckerketten modifizieren, den Effekt der Immunseneszenz durch Abnahme der T-Zellfunktion unterdrücken können. Die Autoren vermuten, dass der funktionelle altersbedingte Defekt in den T-Zellen durch fehlerhafte Signale kurz nach der Aktivierung entsteht, und könnte durchaus mit den Calciumsignalen innerhalb der Zelle in Verbindung gebracht werden.

STIM1 und Orai1, die Hauptkomponenten des speichergesteuerten Calciumeinstroms, sind beide N-glykosylierte Proteine und somit möglicherweise an der durch Hyperglykosylierung induzierten Immunseneszenz beteiligt. Das STIM1 Protein hat 2 Glykosylierungsstellen an den Positionen N131 und N171, wohingegen das Orai1 Protein lediglich eine Konsensussequenz an Position N223 aufweist. In der vorliegenden Arbeit sollte nun der Einfluss posttranslationaler Modifikationen von Oberflächenproteinen auf T-Zellen allgemein, und im speziellen von den Proteinen STIM1 und Orai1, auf die Quantität und Qualität des speichergesteuerten Calciumstroms untersucht werden. Es sollte untersucht werden, ob Enzyme, die den Glykosylierungsstatus von Proteinen verändern können, einen Einfluss auf SOCE in primären humanen CD4⁺ T-Zellen haben. Auch sollte der speichergesteuerte Calciumeinstrom in diesen Zellen in Abhängigkeit vom Alter der Spender betrachtet

werden. Glykosylierungsdefiziente Mutanten von den Proteinen STIM1 und Orai1 sollten hergestellt und im Überexpressionssystem detailliert untersucht und charakterisiert werden.

Williams et al. (Williams et al, 2002) postulierten, dass die Glykosylierung von STIM1 wichtig für die Translokation des Proteins in die PM sei. STIM1 ist ursprünglich als Adhäsionsmolekül in der Plasmamembran in stromalen Zellen des Knochenmarks (Oritani & Kincade, 1996) und als putativer Tumorsuppressor (Sabbioni et al, 1997) identifiziert worden. Während die Funktion von STIM1 als ER Protein (Ca^{2+} Sensor und Aktivator von Orai Kanälen) gezeigt ist, ist die Funktion von STIM1 in der Plasmamembran (PM) umstritten. Mehrere Gruppen zeigen eine konstitutive Expression von STIM1 an der PM, andere zeigen eine verstärkte Translokation an die PM nach Speicherentleerung (Baba & Kurosaki, 2009). Aktivierung von SOCE benötigt nicht die Anwesenheit von STIM1 in der PM, allerdings wird SOCE nach Gabe eines N-terminalen STIM1 Antikörpers partiell inhibiert (Spassova et al, 2006). Li et al. (Li et al, 2007) haben gezeigt, dass STIM1 ohne N-terminale EF-Hand und SAM Domäne ausschließlich an oder nahe an die PM lokalisiert wird. Hier zeigt es zum einen eine Kolo-kalisation mit Orai1 und zum anderen erhöht STIM1 Δ N einen konstitutiven Ca^{2+} Einstrom, welcher in der Strom-Spannungscharakteristik dem Orai1 Strom ähnlich ist. Die Ergebnisse von Li et al., deuten darauf hin, dass eine Interaktion zwischen Orai1 und einer STIM1 Mutante ohne extrazelluläre EF-Hand und SAM Domäne stattfinden kann. In einer weiteren Arbeit wurde die EF-Hand von STIM mutiert (E76A/D87A) (Hewavitharana et al, 2008). Auch diese Konstrukte generieren einen konstitutiven Strom. Bezüglich ihrer Lokalisation zur PM gibt es widersprüchliche Resultate, je nachdem ob die Oberflächenexpression mittels Biotinylierung oder mittels Detektion extrazellulärer Epitope durchgeführt wurde. Die Funktion von STIM1 in der PM ist also unklar und inwieweit sie von der Glykosylierung von STIM1 und Orai1 abhängt ist unbekannt. Deshalb sollte auch der Zusammenhang zwischen STIM1-Glykosylierung und -Lokalisation genauer untersucht werden. Da die Glykosylierungsstellen von STIM1 (N131, N171) in unmittelbarer Nähe zu hochkonservierten Aminosäuren der SAM Domäne liegen, könnte es auch sein, dass nicht die Glykosylierung *per se*, sondern die Struktur der SAM Domäne für die PM Lokalisation/Interaktion mit Orai1 wichtig ist.

Insgesamt sollte aufgeklärt werden, ob die Glykosylierung von STIM1 und Orai1 für die Funktionalität dieser Proteine und für den damit verbundenen CRAC Strom vonnöten ist, und wie die Veränderung des Glykosylierungsstatus von Proteinen den speichergesteuerten Calciumeinstrom beeinflussen kann. Die Analyse der molekularen Mechanismen sollte zur Aufklärung der physiologischen und pathophysiologischen Funktionen der Ca^{2+} Signale in primären Immunzellen beitragen.

4 Material

4.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien, die für diese Arbeit verwendet wurden, von den Anbietern Boehringer Ingelheim, Life Technologies, Merck, Roth, Sigma oder VWR bezogen. Die Standardlaborchemikalien wurden in der Qualität „zur Analyse“ verwendet.

4.2 Reaktions-Kits

BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Dream Taq Green Mix	Fermentas
Dynabeads® Human T Activator CD3/CD28	Life Technologies
Hi Speed Maxi Kit	Qiagen
Phusion Polymerase High-Fidelity PCR Kit	New England Biolabs (NEB)
Qiaprep Spin Mini Kit	Qiagen
QiaQuick Gel Extraction Kit	Qiagen
QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit	Qiagen
Western Lightning™ Plus ECL	Perkin Elmer
CD4 Negative Isolation Kit	Life Technologies

4.3 Zubehör

Ficoll-Paque™plus	Amersham Biosciences, # 17144002
Filter-Spitzen	Eppendorf, Peqlab
Leucosep Röhrchen	Greiner, # 227290
Nitrozellulose Membran	Amersham Pharmacia
PVDF (Polyvinylidene fluoride) Membran	Millipore
steriles Zellkulturmaterial	BD Biosciences
sterile Einmalpipetten	BD Biosciences

4.4 Geräte

Dokumentationsgerät (Gele, Western Blots)	ChemiDoc™ XRS
Elektroporationsmaschine	Nucleofactor II, Lonza

Elektrophorese Stromversorgung	Power Pac HC, Bio-Rad
Fermenter	Minitron Infors-HAT Inkubator1000, Heidolph
Gelelektrophorese Apparat horizontal	Sub-cell GT Agarose Gel Electrophoresis System, Bio-Rad
Gelelektrophorese Apparat vertikal	Mini-Protean Tetra Cell, Bio-Rad Mini VE, Amersham Biosciences
Mikromanipulator	LN Pivot Manipulator, Luigs & Neumann MP 285, Sutter Instruments
Mikroskop	Axio Observer A1, Zeiss Olympus IX 70
Monochromator Polychrom IV	TILL Photonics
Osmometer	Vapro® Vapor pressure Osmometer, Wescor
Patch-clamp Verstärker	EPC10 USB, HEKA electronics
PCR-Maschine	Master Cycler, Personal 5332, Eppendorf
Photometer	Biophotometer, Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetboy Acu, Integra Biosciences
Plattenspektralphotometer	Tecan GeniosPro
Puller	DMZ Universal Puller, Dagan
Real Time System CFX 96/ Thermal Cycler C1000	BioRad
Sonifier	Sonifier Branson 250
Sterilbank	HERAsafe ClassII (KS12)
Thermomixer	Thriller, Peqlab Thermocell CHB-202, Bioer
Wasserbad	Lauda A100

Zellkultur Inkubator	Hera Cell 150, Thermo Scientific
Zentrifugen	Tischzentrifuge 5415C, Eppendorf Mini Spin 5452, Eppendorf Universal 32R, Hettich Mikro 220R, Hettich Universal 30F, Hettich Laborzentrifuge 1.14, Sigma

4.5 Zellkulturmedien und Puffer

<u>Medium</u>	<u>Bezugsquelle und Bestellnummer</u>	<u>Zusätze</u>
AIMV	Life Technologies, # 12055	10 % fetales Kälberserum (Life Technologies)
DMEM	Life Technologies, # 41966	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin (Life Technologies, # 15140) 10 % fetales Kälberserum (Life Technologies, # 10270)
MEM	Life Technologies, # 31095	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin (Life Technologies, # 15140) 10 % fetales Kälberserum (Life Technologies, # 10270)
RPMI-1640	Life Technologies, # 21875	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin (Life Technologies, # 15140) 10 % fetales Kälberserum (Life Technologies, # 10270)
DPBS	Life Technologies, # 14190	
HBSS	PAA Laboratories GmbH, # H15-009	

4.6 Größenstandards

1 kb DNA Leiter	Life Technologies
Dual Color Proteinmarker	Bio-Rad

4.7 DNA-Plasmide

pBlueScriptII	Stratagene
pCAGGS	J. Miyazaki
pMax	Addgene
pEX	Addgene

4.8 Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme

Restriktionsendonukleasen

Alle Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs (NEB) bezogen.

Modifizierende Enzyme

Antarctic Phosphatase	Roche
Phusion Polymerase	Finnzymes, NEB
T4-DNA- Polymerase	NEB
T4-DNA- Ligase	NEB
Taq-Polymerase	Peqlab

4.9 Antikörper

Primäre Antikörper	Verdünnung	Typ	Bezugsquelle
α STIM1	1:500	monoklonaler AK aus Maus	BD, Abnova
α STIM2	1:500	monoklonaler AK aus Maus	Sigma
α Orai1	1:2000	polyklonaler AK aus Hase	Sigma
α GAPDH	1:1000	monoklonaler AK aus Ratte	Cell signaling
α Calnexin	1:1000	polyklonaler AK aus Hase	Stressgen
α γ -Tubulin	1:1000	polyklonaler AK aus Hase	Sigma

Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Typ	Bezugsquelle
α Maus	1:5000	aus Ziege	Sigma
α Hase	1:30000	aus Affe	Amersham
α Ratte	1:10000	aus Ziege	Amersham

Alle sekundären Antikörper sind Meerrettich Peroxidase gekoppelt.

Antikörper für Immunfärbungen	Verdünnung	Typ	Bezugsquelle
α HA, Alexa Fluor 488 conjugated	1:100	Monoklonaler AK aus Maus	Life Technologies

4.10 Antibiotika

Die in der zugrunde liegenden Arbeit verwendeten Antibiotika wurden von der Firma Applichem bezogen.

<u>Stocklösung</u>	<u>Endkonzentration</u>
50 mg/ml Ampicillin in H ₂ O	100 μ g/ml
50 mg/ml Kanamycin in H ₂ O	50 μ g/ml

4.11 Kompetente Zellen für die Klonierung

Zur Amplifikation von Plasmiden wurden kompetente XL1 blue Zellen verwendet.

4.12 DNA-Konstrukte

4.12.1 Ori Konstrukte

Konstrukt	Primernamen	Primersequenz 5' \rightarrow 3'
Orai1 pCAGGs_IRES_GFP	BAN 416 BAN 392	GGCGATATCCTAGGCATAGTGGCTGCCGG 5'PHO-CGCCACCATGCATCCGGAGCCCGC
Orai1 pCAGGs_IRES_RFP	BAN 416 BAN 392	GGCGATATCCTAGGCATAGTGGCTGCCGG 5'PHO-CGCCACCATGCATCCGGAGCCCGC
Orai2 pCAGGs_IRES_GFP	BAN 394 BAN 402	5'PHO-CGCCACCATGAGTGCTGAGCTTAACGTG 5'PHO-TCACAAGACCTGCAGGCTGCG
Orai3 pCAGGs_IRES_GFP	BAN 397 BAN 403	5'PHO-CGCCACCATGAAGGGCGGCGAGGG 5'PHO-TCACACAGCCTGCAGCTCCC
Orai1N223A pCAGGs_IRES_GFP	BAN 563 BAN 564	CCAGTGGCGCAGCAGCCGCCGTCAGCACCAGCGGCATC GATGCCGCTGGTGCTGACGGCGGCTGCTGCGCCACTGG

Orai1 C-RFP/GFP pMax	BAN 416 BAN 392	GGCGATATCCTAGGCATAGTGGCTGCCGG 5'PHO-CGCCACCATGCATCCGGAGCCCGC
Orai1 MO70 \emptyset IRES_GFP	BAN 416 BAN 392	GGCGATATCCTAGGCATAGTGGCTGCCGG 5'PHO-CGCCACCATGCATCCGGAGCCCGC
Orai1 R91W pCAGGs IRES_GFP	BAN 416 BAN 392	GGCGATATCCTAGGCATAGTGGCTGCCGG 5'PHO-CGCCACCATGCATCCGGAGCCCGC
pEF Orai1 D neo Δ 70-87GST	BAN 416 BAN 392	GGCGATATCCTAGGCATAGTGGCTGCCGG 5'PHO-CGCCACCATGCATCCGGAGCCCGC

4.12.2 STIM1 Konstrukte

Konstrukt	Primernamen	Primersequenz 5' \rightarrow 3'
STIM1 pCAGGs_IRES_GFP	BAN 417 BAN 418	GCCGCCACCATGGATGTATGCGTCCGTCTTG CTTCTTAAGAGGCTTAAAG
STIM1 pCAGGs_IRES_RFP	BAN 417 BAN 418	GCCGCCACCATGGATGTATGCGTCCGTCTTG CTTCTTAAGAGGCTTAAAG
STIM1FQ pCAGGs_IRES_RFP	Ban 417 BAN 638	GCCGCCACCATGGATGTATGCGTCCGTCTTG TCACTGGAACCTTCTTAAGAGGCTTCTTAAAG
STIM1 Δ KK pCAGGs_IRES_RFP	Ban 417 BAN 715	GCCGCCACCATGGATGTATGCGTCCGTCTTG CTAAAGAGGCTTCTTAAAGATTTTG
STIM1 N131D pCAGGs_IRES_RFP	BAN 581 BAN 582	GGAAGTCATCAGAAGTATACGACTGGACCGTGGATGAGGTGG CCACCTCATCCACGGTCCAGTCGTATACTTCTGATGACTTCC
STIM1 N131Q pCAGGs_IRES_RFP	BAN 617 BAN 618	GGAAGTCATCAGAAGTATACCAATGGACCGTGGATGAGGTGG CCACCTCATCCACGGTCCATTGGTATACTTCTGATGACTTCC
STIM1 N171Q pCAGGs_IRES_RFP	BAN 583 BAN 584	CAAGGCTGGCTGTCACCCAGACCACCATGACAGGGACTG CAGTCCCTGTCATGGTGGTCTGGGTGACAGCCAGCCTTG
STIM1 N131DN171Q pCAGGs_IRES_RFP	BAN 581 BAN 582 BAN 583 BAN 584	GGAAGTCATCAGAAGTATACGACTGGACCGTGGATGAGGTGG CCACCTCATCCACGGTCCAGTCGTATACTTCTGATGACTTCC CAAGGCTGGCTGTCACCCAGACCACCATGACAGGGACTG CAGTCCCTGTCATGGTGGTCTGGGTGACAGCCAGCCTTG
STIM1 N131DN171QFQ pCAGGs_IRES_RFP	Ban 417 BAN 638	GCCGCCACCATGGATGTATGCGTCCGTCTTG TCACTGGAACCTTCTTAAGAGGCTTCTTAAAG
STIM1 N131DN171Q Δ KK pCAGGs_IRES_RFP	Ban 417 BAN 715	GCCGCCACCATGGATGTATGCGTCCGTCTTG CTAAAGAGGCTTCTTAAAGATTTTG
STIM1 N131QN171Q pCAGGs_IRES_RFP	BAN 617 BAN 618 BAN 583 BAN 584	GGAAGTCATCAGAAGTATACCAATGGACCGTGGATGAGGTGG CCACCTCATCCACGGTCCATTGGTATACTTCTGATGACTTCC CAAGGCTGGCTGTCACCCAGACCACCATGACAGGGACTG CAGTCCCTGTCATGGTGGTCTGGGTGACAGCCAGCCTTG
STIM1 N131EN171Q pCAGGs_IRES_RFP	BAN 725 BAN 726 BAN 583 BAN 584	GGAAGTCATCAGAAGTATACGAGTGGACCGTGGATGAGGTGG CCACCTCATCCACGGTCCACTCGTATACTTCTGATGACTTCC CAAGGCTGGCTGTCACCCAGACCACCATGACAGGGACTG CAGTCCCTGTCATGGTGGTCTGGGTGACAGCCAGCCTTG

STIM1 N131DN171D pCAGGs_IRES_RFP	BAN 581 BAN 582 BAN 701 BAN 702	GGAAGTCATCAGAAGTATACCAATGGACCGTGGATGAGGTGG CCACCTCATCCACGGTCCATTGGTATACTTCTGATGACTTCC CAAGGCTGGCTGTCACCGACACCACCATGACAGGGACTG CAGTCCCTGTCATGGTGGTGTGCGGTGACAGCCAGCCTTG
STIM1 C-mEGFP pMax	BAN 417 BAN 418	GCCGCCACCATGGATGTATGCGTCCGTCTTG CTTCTTAAGAGGCTTAAAG
STIM1 N131DN171Q C-mEGFP pMax	BAN 417 BAN 418	GCCGCCACCATGGATGTATGCGTCCGTCTTG CTTCTTAAGAGGCTTAAAG
STIM1 N-YFP pEx	BAN 417 BAN 418	GCCGCCACCATGGATGTATGCGTCCGTCTTG CTTCTTAAGAGGCTTAAAG
STIM1 N131DN171Q N-YFP pEx	BAN 417 BAN 418	GCCGCCACCATGGATGTATGCGTCCGTCTTG CTTCTTAAGAGGCTTAAAG
STIM1 C-RFP/GFP pMax	BAN 417 BAN 418	GCCGCCACCATGGATGTATGCGTCCGTCTTG CTTCTTAAGAGGCTTAAAG
STIM1 N131DN171Q C-RFP/GFP pMax	BAN 417 BAN 418	GCCGCCACCATGGATGTATGCGTCCGTCTTG CTTCTTAAGAGGCTTAAAG

4.12.3 Sonstige Konstrukte

Konstrukt	Primernamen	Primersequenz 5' → 3'
Sialidyltransferase (ST6-Gal1) pCAGGs_IRES_GFP	BAN 556 new BAN 555 new	GGCTTAGCAGTGAATGGTCCGG GGCGCCGCCACCATGATTCACACCAACCTGAAG
STIM1-CD4TM-ChimereFQ pCAGGs_IRES_RFP	Ban 417 BAN 638	GCCGCCACCATGGATGTATGCGTCCGTCTTG TCACTGGAACCTTCTTAAGAGGCTTCTTAAAG
CD4-KKFQ pCAGGs_IRES_RFP	BAN 570 BAN 703	GCCACCATGAACCGGGGAG TCACTGGAACCTTCTTAATGGGGCTACATGTCTTCTG

4.12.4 qRT-PCR Primer

Konstrukt	Primernamen	Primersequenz 5' → 3'
Grp 78	BAN 758 BAN 759	CCACCAGGATGCAGACATTG AGGGCCTCCACTTCCATAGA
STIM1	STIM1_forw_766 STIM1_rev_871	CAGAGTCTGCATGACCTTCA GCTTCCTGCTTAGCAAGGTT
Orai1	ORAI1_forw_190 ORAI1_rev_332	ATGAGCCTAAACGAGCACT GTGGGTAGTCGTGGTCAG
ST6 Gal-1	BAN 705 BAN 706	CCTCTGGGATGCTTGGTATC GTGCAGGCACTATCGAAGAA

4.12.5 Sequenzierungs-Primer für Vektorplasmide

Vektorplasmid	Primername	Primersequenz 5' → 3'	Tm °C
pCAGGs	pCAGGs for	AACGTGCTGGTTATTGTGC	56
pCAGGs	pCAGGs rev	ACCTTCTGATAGGCAGCC	56
pMax	BAN345 pMax for	GATTGGTGCGTTTTA	56
pMax	BAN346 pMax rev	ACCTCCCACACCTCCCC	60

4.13 siRNA

Bezeichnung, Target	Bezugsquelle/ Information
HS_ERN1-6 + HS_ERN1-6, IRE1	Qiagen Flexitube, getestet (experimentally verified)
HS_Eif2ak3-5 + HS_Eif2ak3-6, PERK1	Qiagen Flexitube

5 Methoden

5.1 Zellkultur

Die Kultivierung aller verwendeten Zellen erfolgte, unter Zufuhr von 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 %, in einem Inkubator bei 37 °C. Die adhärenenten Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin abgelöst und dreimal wöchentlich passagiert. Die Zellen in Suspension wurden dreimal wöchentlich verdünnt.

5.1.1 Verwendete Zelllinien

5.1.1.1 HEK293- Zellen

Die HEK293-Zellen (ATCC-Nr. CRL-1573) wurden in MEM + 10 % FCS + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin kultiviert.

5.1.1.2 Stabil transfizierte HEK293-STIM1-Zellen und HEK293-Orai1-Zellen

Die stabilen HEK293-Orai1-Zellen (Orai1 WT und Orai1 N223A) wurden in DMEM + 10 % FCS + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 5 µg/ml Puromycin kultiviert. Hergestellt wurden sie von Dr. Dalia Al Ansary. Hierzu wurden die entsprechenden Konstrukte in einen MO70 Vektor mit deletierter cite- und GFP-Sequenz kloniert. HEK293 Zellen wurden mit dem Konstrukt transfiziert (Fugene, siehe 5.2) und ab dem zweiten Tag nach der Transfektion für zwei Wochen mit 3 µg/ml Puromycin im Medium behandelt. Ab der dritten Woche der Kultivierung wurde die Puromycindosis auf 1 µg/ml verringert. Die überlebenden Zellklone wurden in Wells einer 96-Well Platte vereinzelt. Die Klone wurden hochgezogen und in Western Blot Analysen auf das Vorhandensein des korrekten Konstrukts gescreent. Positive Klone wurden sequenziert. Die stabilen HEK293-STIM1-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Soboloff zur Verfügung gestellt und in DMEM + 10 % FCS + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 500 µg/ml Geneticin (G418, Life Technologies) kultiviert.

5.1.1.3 Jurkat T-Zellen

Der Jurkat T-Zellklon E6.1 (ATCC-Nr. TIB-152) wurde in RPMI 1640 + 10 % FCS + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin kultiviert.

5.1.2 Isolation von CD4⁺ T-Zellen aus humanem Vollblut

5.1.2.1 Isolation peripherer mononukleärer Zellen aus humanem Vollblut

Die Isolation peripherer mononukleärer Zellen aus humanem Vollblut erfolgte unter Verwendung von Leukozyten Reduktionskammern (LRS chamber, TrimaAccel System, siehe Abbildung 4), die uns von dem Blutspendedienst der Universitätskliniken des Saarlandes (Abteilung für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin) zur Verfügung gestellt wurden. Alle Arbeitsschritte wurden zügig bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zellen wurden durch Spülen der Reduktionskammer mit 60 ml HBSS gesammelt. Anschließend wurden die PBMCs durch eine Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Paque™plus, Amersham Biosciences, #17144002) in Leucosep-Röhrchen (Greiner, #227290) isoliert.

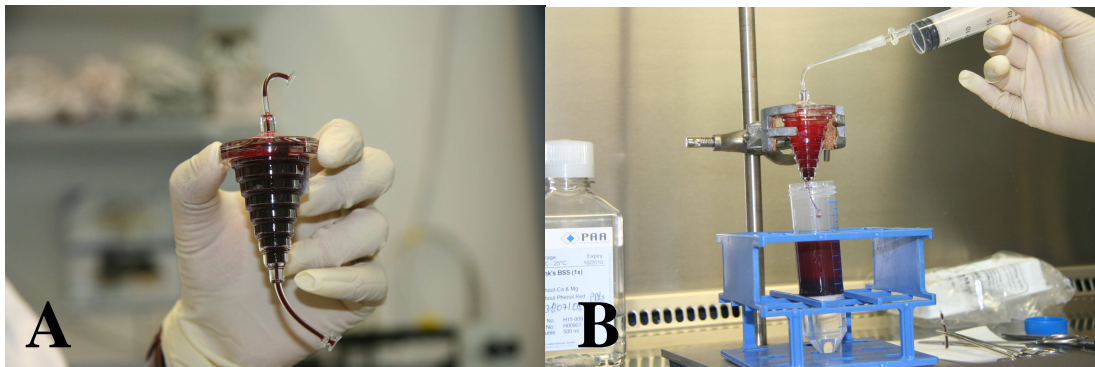


Abbildung 4: Isolation von PBMCs aus einer Leukozyten Reduktionskammer; A Aufnahme einer Leukozyten Reduktionskammer B Ausspülen der Zellen mit HBSS aus dem Reduktionsfilter in ein Leucosep-Röhrchen

5.1.2.2 Negativ-Bead-Isolation von CD4⁺ T-Zellen

Die Negativ-Bead-Isolation von CD4⁺ T-Zellen erfolgte unter Verwendung des Dynal® CD4 Negative Isolation Kits von Dynal Biotech. Es wurden keine kompletten Blutproben, sondern zuvor isolierte PBMCs zur Aufreinigung eingesetzt. Alle Arbeitsschritte wurden gemäß des Herstellerprotokolls durchgeführt, allerdings wurde anstelle des Puffers 1 (PBS + 0,1 % BSA + 2 mM EDTA) ein Puffer mit 0,5 % BSA und ohne EDTA verwendet.

Die CD4⁺ T-Zellen wurden nun bis zur Durchführung der Experimente in AIMV + 10 % FCS kultiviert.

5.1.2.3 Stimulation der CD4⁺ T-Zellen

Um die naiven CD4⁺ T-Zellen in den Effektorstatus zu überführen, wurden die Zellen zwei Tage nach der Isolation und drei bis fünf Tage vor den Experimenten mit CD3/CD28 gecoateten Beads (Dynal Beads, Life Technologies) im Verhältnis 1:1 stimuliert. Hierzu wurden die Beads dreimal in AIMV oder PBS gewaschen und anschließend zu den Zellen gegeben. Die Stimulation löste ein vermehrtes Zellwachstum und verstärkte Zellteilung aus. Bei Erniedrigung des pH Wertes im Medium, wurde frisches Medium zu den Zellen hinzu gegeben.

5.1.3 Vorbehandlung der Zellen

Für einige Experimente wurden die Zellen für einen bestimmten Zeitraum in Medium kultiviert, dem bestimmte Substanzen zugesetzt waren.

<u>Substanz</u>	<u>Lösemittel</u>	<u>End-konzentration</u>	<u>Inkubationsdauer</u>	<u>Bezugsquelle</u>
MG-132	DMSO	1 µM	3-6 h oder üN	Calbiochem, 474790
Mimosin	NaOH	250 µM	üN	Sigma, MO253
Swainsonin	Methanol	0,5 µM	üN	Sigma, S9263

Tunicamycin	DMSO	3 µg/ml	üN	Sigma, T7765
Klotho	DMEM Ø FCS Ø Pen/Strep	100 pM	üN	R&D systems, 5334-KL
Neuraminidase	Wasser	0,05 U/µl	üN	Roche, 1585886
α 2,3-Siase	Wasser	250 U/ml	üN	NEB, P0782
Caspase-3 Inhibitor V	DMSO	20 µM	üN	Calbiochem, 219002

5.2 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion von DNA-Konstrukten in HEK293 Zellen wurde auf chemischem Wege mit dem Fugene®HP Transfection Reagent (Roche) durchgeführt oder die Zellen wurden mit dem Nucleofector™ II (Lonza) elektroporiert. Die transiente Transfektion von DNA-Konstrukten in Jurkat T-Zellen wurde immer mit dem Nucleofector™ II (Lonza) durchgeführt.

Für die Transfektion mit Fugene wurden x µg der DNA mit 100 µl Optimem-I Medium/Glutamax-I (Life Technologies) und 5 µl des Fugene Transfektionsreagenzes gemischt. Nach 15 - 45 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsmix direkt auf 60 - 70 % konfluente HEK293-Zellen in Kulturmedium ohne Penicillin/Streptomycin gegeben. Die Experimente wurden 24 - 48 h nach der Transfektion durchgeführt.

Für die Transfektion durch Elektroporation wurden eine Million HEK293-Zellen oder ein bis zwei Millionen Jurkat T-Zellen durch eine dreiminütige Zentrifugation bei 1700 g sedimentiert. Anschließend nahm man die Zellen in 100 µl Nucleofector solution auf, gab x µg der DNA hinzu und elektroporierte die Zellen im Nucleofector™ II (Lonza). Die Zellen konnten anschließend in Kulturmedium ohne Penicillin/Streptomycin mit 50 µM β-Mercaptoethanol ausgesät werden.

Die transiente Transfektion von siRNA wurde mit dem Nucleofector™ II (Lonza) via Elektroporation durchgeführt. Die Durchführung entspricht der oben beschriebenen Transfektion von DNA Konstrukten, allerdings sollten alle Pipettenspitzen gestopft sein und die siRNA muss während des Transfektionsprozesses auf Eis gelagert werden.

5.3 Immunhistochemische Färbung und Fluoreszenzaufnahmen mit dem Zeiss Cell Observer

Um die Lokalisation von hCD4, einer STIM1-hCD4 Chimeren und beiden Molekülen nach Anhängen eines ER-Retentionsmotifs (hCD4KKFQ, ChimeraX1FQ) zu bestimmen, wurden entsprechend transfizierte HEK293 Zellen immunhistochemisch gefärbt. Die auf 12 mm Deckgläsern ausgesäten Zellen wurden 48 h nach Transfektion in PBS gewaschen und für 20 min mit einer 4 %-igen eiskalten PFA Lösung inkubiert. Mit diesem Schritt erfolgte die Fixierung der Zellen. Um das PFA vollständig von den Zellen zu entfernen, wurden diese für drei Minuten mit einer 0,1 M Glycin in PBS-

Lösung gewaschen. Für die Permeabilisierung folgte eine 20 minütige Inkubation in 0,1% Triton. Unspezifische Antikörperbindestellen wurden geblockt, indem die Zellen für 20 min in PBS mit 2 % BSA (im Falle der permeabilisierten Zellen + 0,1% Triton) inkubiert wurden. Da die zu untersuchenden Konstrukte mit einem HA-Tag versehen waren, wurde zur Detektion der Proteine ein Alexa 488 gekoppelter Anti-HA Antikörper in der Verdünnung 1:100 in Blockingpuffer verwendet. Die fixierten Zellen wurden für 1,5 h mit der Antikörperlösung im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Deckgläser zweimal jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen und die gefärbten und fixierten Zellen anschließend mit 3 µl mounting medium versiegelt. Für die Fluoreszenzaufnahmen wurde das Cell Observer HS System der Firma Zeiss verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Standard-Epifluoreszenz Mikroskop, das mit LED-Lichtquellen von Zeiss (Colibri) und einer AxioCam MRm R.3 CCD-Kamera (Zeiss) ausgestattet ist. Alle Komponenten des Systems werden über die Zeiss Software AxioVision 4.7 angesteuert. Für die Fluoreszenzaufnahmen wurde ein farbkorrigiertes Öl-Immersionsobjektiv mit hoher numerischer Apertur genutzt (63x Plan-Apochromat N.A. 1.4, Zeiss), welche höchste optische Auflösung ermöglicht. Zur Anregung wurde die LED Intensität bei 25 % gehalten und die Belichtungszeiten waren bei allen Aufnahmen konstant. Als Filter wurde ein 488 nm GFP Filter verwendet.

5.4 Biochemische Methoden

5.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

Für die Herstellung von Proteinlysaten aus HEK293-Zellen wurden diese zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 75 – 150 µl RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren (pro Dish/ Ø 30 mm) aufgenommen und für 30 – 60 min bei 4 °C geschüttelt und anschließend eingefroren. Das Auftauen erfolgte in einem Schüttler bei 4 °C. Da die Zellmembran in diesem Stadium sehr instabil war, erhöhte dieser Schritt die Proteinausbeute. Zur weiteren Verbesserung der Proteinausbeute wurden die Lysate mit einem Ultraschallgerät dreimal 30 s sonifiziert. Danach wurden die Lysat-Zell-Gemische 20 – 30 min bei 4 °C und 20000 g zentrifugiert. Der Überstand enthielt das Proteinlysat und wurde in ein neues Gefäß überführt.

<u>RIPA-Puffer</u>	
150 mM	NaCl
5 mM	Tris-HCl
0,5 %	Sodium deoxycholate
1 %	Nonident P40
0,1 %	SDS
5 mM	EDTA, pH 8,0

<u>Proteaseinhibitoren-Mix</u>	
1 µg/ml	Leupeptin
0,1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
1 mM	Pepstatin A
0,3 µM	Aprotinin
1 mM	Benzamidin

Um den Glykosylierungsgrad von den Proteinen STIM1 und Orai1 zu untersuchen, wurden die Proteinlysate in einigen Experimenten mit folgenden Substanzen behandelt.

Substanz	Konzentration	Bezugsquelle
PNGaseF	500000 Units/ml	New England Biolabs
EndoH	15000 Units/ml	New England Biolabs

Hierfür wurden die Lysate zunächst nach Herstelleranweisung in einem Denaturierungspuffer für zehn Minuten bei 95 °C denaturiert, dann auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend mit dem Enzym für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

5.4.2 Proteinbestimmung (BCA, Bicinchoninic acid reaction)

Eine häufig für die Proteinbestimmung angewandte Methode ist die so genannte Biuret-Reaktion. Mit dieser kalorimetrischen Nachweismethode können Proteine, oder genauer deren Peptidbindungen, nachgewiesen werden. Das Nachweisprinzip beruht auf der Ausbildung eines farbigen Komplexes zwischen Peptidbindungen und zweiwertigen Kupferionen. Durch die Verwendung von BSA (Bovine serum albumin) Stocklösungen bekannter Konzentration kann eine Eichkurve aufgenommen werden, mit deren Hilfe man anschließend die Proteinkonzentration eines Proteinlysats unbekannter Konzentration bestimmen kann.

Hierzu wurden 200 µl des Proteinbestimmungsreagenzes mit 25 µl der Probe in einem Well einer 96-Well-Platte gemischt und für 30 min schüttelnd bei 65 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Platte auf Raumtemperatur konnte diese im Plattenspektralphotometer bei einer Absorption von 540 nM ausgewertet werden. Jede Proteinprobe wurde in drei verschiedenen Verdünnungen jeweils dreifach bestimmt.

5.4.3 SDS-Gel Elektrophorese

Die SDS Gelelektrophorese ist eine weit verbreitete, analytische Methode der Biochemie zur Untersuchung von Proteinen.

Die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine wird durch Zugabe von reduzierenden Agenzien, wie z.B. DTT (Dithiothreitol) oder β -Mercaptoethanol zu dem Proteinlysate und durch Erhitzen der Proben auf Temperaturen über 90 °C zerstört. Die Proteine wechselwirken mit dem SDS (Sodium-dodecyl-Sulfat) im Laufpuffer, welches so die Eigenladung der Proteine mit einer negativen Ladung überdeckt. Die Proteinproben können anschließend im elektrischen Feld in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Die nun negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld, mit einer auf ihre Größe angepassten Geschwindigkeit, zum positiven Pol.

Zur optimalen Auftrennung der Proteinprobe eignen sich so genannte diskontinuierliche SDS-Gele nach Ulrich Laemmli. Hierbei unterscheidet man ein zur Aufkonzentration der Probe geeignetes Sammelgel, von einem zur eigentlichen Auftrennung der Proteine benötigten Trenngel. Die beiden Gele unterscheiden sich in Porengröße und pH-Wert. Die Menge an Polyacrylamid in den Gelen kann variiert werden. Für größere Proteine verwendet man eher Gele mit einem niedrigen Polyacrylamidgehalt, während kleinere Proteine mit höher prozentigen Gelen schärfer getrennt werden können. Das Sammelgel sollte allerdings in jedem Fall mindestens 3 % weniger Polyacrylamid aufweisen, als das Trenngel.

Nach der Proteinbestimmung konnte so eine bestimmte Menge (75 – 100 μ g) an Protein auf ein Polyacrylamidgel in einer horizontalen Kammer aufgetragen werden. Als Größenstandard wurde auf jedes Gel auch ein Proteinmarker mit aufgetragen. Der verwendete Laufpuffer war ein einfacher SDS Puffer. Bis die Proben das Trenngel erreichten, wurde eine Spannung von 85 mV angelegt, danach erfolgte die Auftrennung bei 150 mV.

<u>Sammelgel Puffer (SG-Puffer), pH 6,8</u>		<u>Trenngel Puffer (TG-Puffer), pH 8,8</u>	
0,5 M	Tris-HCl	1,5 M	Tris-HCl
0,4 %	SDS	0,4 %	SDS

<u>2x Laemmli Puffer, pH 6,8</u>		<u>10x SDS Elektrophorese Puffer, pH 8,8</u>	
Konzentration	Substanz	Konzentration	Substanz
8 %	SDS	250 mM	Tris-HCl
120 mM	Tris-HCl	1 % (w/v)	SDS
20 % (v/v)	Glycerol	1,92 % M	Glycin
10 % (v/v)	β -Mercaptoethanol		
0,01 % (w/v)	Bromphenolblau		

Die Zusammensetzung der Gele war wie folgt:

	Sammelgel (SG), 5 %	Trenngel (TG), 10 %
4 x SG- bzw. TG-Puffer	1,25 ml	2,5 ml
40 % Acrylamid	0,63 ml	2,5 ml
H ₂ O	3,08 ml	4,91ml
10 % APS	37,5 µl	75 µl
TEMED	7,5 µl	15 µl

5.4.4 Western Blot Analysen

Die 1979 im Labor von George Stark an der Universität von Stanford entwickelte Methode dient dem Nachweis von Proteinen auf einem geeigneten Träger wie z.B. Nitrocellulose oder PVDF. Hierzu werden im SDS-Gel aufgetrennte Proteine in einem elektrischen Feld auf eine Membran transferiert und immobilisiert. Die Bindung der Proteine an die Nitrocellulosemembran erfolgt durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen. PVDF Membranen hingegen sind für eine bessere Proteinretention bekannt (Lauritzen & Pluskal, 1988). Das ursprünglich im Trenngel erhaltene Muster der Proteine wird exakt erhalten. Anschließend können die Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen das Protein direkt oder gegen einen angehängten Proteintag nachgewiesen werden.

Durch Anlegen einer Spannung von 350 mV wandern die negativ geladenen Proteine auf die Trägermembran. Die Dauer des Blotting-Vorganges hängt von der Größe der zu transferierenden Proteine und der Membran ab und war daher individuell anzupassen. Von Proteinen freie Stellen auf der Membran wurden nach dem eigentlichen Blotting-Vorgang durch Inkubation in einer 5 %-igen Magermilchlösung in TBS-T Puffer (TBS Puffer + 0,1 % Tween 20) geblockt, wodurch unspezifische Antikörperbindungen reduziert werden. Primäre Antikörper wurden in PBS mit 1 % BSA und 0,02 % NaN₃ verdünnt und über Nacht mit der Membran bei 4 °C inkubiert.

Blotting Puffer, pH 8,3	
1 %	SDS
250 mM	Tris-HCl
1,92 M	Glycin
20 %	Methanol

5.4.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen mit Hilfe der „enhanced chemiluminescence reaction“ (ECL-Reaktion)

Die ECL-Reaktion stellt eine Nachweismethode dar, mit der Peroxidase gekoppelte Antikörper im Western Blot sichtbar gemacht werden können. Hierzu sind die sekundären Antikörper, die den Komplex aus Protein und primärem Antikörper erkennen, mit dem Enzym Peroxidase aus Meerrettich gekoppelt. Die Peroxidase oxidiert das Luminol in der Entwicklerlösung in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid, wodurch das angeregte Luminol unter Lichtemission wieder in den Grundzustand zurück fällt. Diese Lichtemission kann mit dem ChemiDoc™ XRS Dokumentationsgerät aufgenommen werden.

Für den Nachweis von Proteinen in Western Blot Analysen, wurden die Membranen, auf denen bereits der Komplex aus Protein und primärem Antikörper immobilisiert war, zunächst dreimal jeweils zehn Minuten mit TBS-T Puffer gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper in einer 5 % -igen Magermilchlösung für eine Stunde inkubiert. Um den überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran nun zweimal jeweils zehn Minuten in TBS-T und einmal zehn Minuten in TBS gewaschen, da das Tween 20 aus der TBS-T Lösung die ECL-Reaktion blockiert. Für die Entwicklung wurden die ECL Reagenzien im Verhältnis 1:1 gemischt und für eine Minute auf den Blot gegeben. Anschließend wurde der Blot in Folie gepackt und die Lumineszenzreaktion mit einer CCD (charge coupled device) Kamera aufgenommen.

10 x TBS-Puffer pH 7,5	
5 mM	Tris-HCl
9 % 1,5 mM	NaCl

5.4.6 Redetektion

Es besteht die Möglichkeit, eine mit immobilisierten Proteinen besetzte und entwickelte Membran von den Antikörpern zu befreien, ohne die Proteinauftrennung zu verändern, und die Membran dann erneut mit Antikörpern gegen ein anderes Protein zu inkubieren und zu entwickeln. Diese Methode wird z.B. genutzt, um nach der Detektion des Proteins von Interesse, auch die Expressionsstärke von so genannten Haushaltsproteinen als Kontrollproteine zu überprüfen.

Hierzu wurde die Membran viermal jeweils fünf Minuten in TBS-T gewaschen und anschließend für 45 min bei 55 °C in einem „stripping buffer“ inkubiert. Nachdem die Membran dann sechsmal jeweils fünf Minuten in TBS-T gewaschen wurde, konnte die Membran erneut geblockt und mit einem anderen primären Antikörper inkubiert werden.

„Stripping buffer“	
62,5 mM	Tris-HCl pH 6,8
2 %	SDS

5.4.7 Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP)

Die Ko-Immunopräzipitation ist eine biochemische Methode mit der man Protein-Protein Wechselwirkungen nachweisen kann. Das Prinzip beruht darauf, dass man mit einem spezifischen Antikörper ein Protein, für welches die Interaktionspartner gesucht werden, aus einer Lösung, meist einem Zelllysate, isoliert. Mit dem Antikörper isoliert man so nicht nur das gewünschte Protein, sondern auch alle direkten Interaktionspartner. Die Proteinkomplexe werden anschließend über die SDS-Gel Elektrophorese aufgetrennt und die Anwesenheit der potentiellen Interaktionspartner mit einem spezifischen Antikörper kontrolliert.

Hierfür wurden HEK293 Zellen in einer 75 cm² Zellkulturflasche bei 70 %-iger Zelldichte mit den entsprechenden Plasmiden kotransfiziert und 48 h nach Transfektion lysiert (siehe 5.4.1). Das Zelllysate wurde in zwei Gefäße gleichmäßig verteilt. Um das entsprechende Protein und seine Interaktionspartner zu komplexieren gab man 2-6 µg eines polyklonalen Antikörpers gegen das Protein zu einem Teil des Zelllysates und ließ dieses über Nacht bei 4 °C schütteln. Den anderen Teil des Zelllysates unterzog man ohne Antikörper der gleichen Prozedur. DNA gab man 90 µl in RIPA Puffer gewaschene Protein A Beads zu beiden Fraktionen des Zelllysates und ließ diese für weitere drei Stunden bei 4 °C inkubieren. Das Zelllysate ohne Behandlung mit dem Antikörper diente als Kontrolle, ob es unspezifische Bindungen an die Protein A Beads geben würde. Um die Proteinkomplexe aufzureinigen wurden die Proben zwei Minuten bei 500 g zentrifugiert. Eine Kontrollprobe wurde aus dem Überstand genommen und mit dem gleichen Volumen an zweifach Laemmli gemischt, der Rest des Überstandes wurde verworfen. Die Pellets wurden nun viermal mit 1 ml RIPA Puffer gewaschen und anschließend in 45 µl zweifach Laemmli Puffer resuspendiert. Alle Proben wurden fünf min bei 95 °C denaturiert und durch die SDS-Gel Elektrophorese (siehe 5.4.3) aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und die Anwesenheit der potentiellen Interaktionspartner mit entsprechenden Antikörpern untersucht.

5.4.8 Detektion von membranständigen Proteinen mit Hilfe der Biotinylierung

Die Biotinylierung ist eine molekularbiologische Methode bei der man bestimmte Moleküle wie z.B. in unserem Fall membranständige Proteine, mit Biotin (Vitamin H) koppeln kann und sich anschließend die starke Wechselwirkung zwischen Biotin und Avidin zunutze macht, um die gewünschte Proteinfraction von den restlichen Proteinen zu isolieren. Biotin gehört zu den Vitaminen aus dem B-Komplex und ist in der Lage Proteine zu binden. Polare Derivate von Biotin wie z.B. N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) Ester sind geladene Moleküle und daher sehr gut wasserlöslich und nicht membrangängig. Solange eine Zelle nun intakt ist, kann das Biotin lediglich Proteine an der Oberfläche der Zelle binden. Biotin gebundene Proteine können nach der Denaturierung der Zelle dann mittels Avidin gekoppelten Agarosebeads isoliert werden. Biotin bindet an Avidin über nicht kovalente Wechselwirkungen mit einer außerordentlich hohen Affinitätskonstante von $K_a=10^{15}M^{-1}$.

Die Zellen, die das Protein von Interesse exprimierten, wurden in 75 cm² Kulturflaschen (BD) kultiviert. Zunächst wurden die Zellen zweimal mit jeweils 10 ml PBSB (PBS + 1 mM MgCl₂ + 0,5 mM CaCl₂, pH 8) gewaschen und dann mit 9 ml NHS-Biotin (0,5 mg/ml) für 30 min bei 4 °C inkubiert. Ungebundenes Biotin wurde durch zwei Waschschrte mit je 10 ml PBSB (PBS + 0,1 % BSA, pH 8) entfernt. Zum Ablösen der Zellen von dem Boden der Kulturflasche wurden die Zellen

etwa eine Minute mit 10 ml zwei mM EDTA in PBS (pH 7,4) inkubiert, anschließend resuspendiert und in ein 15 ml Falcon Gefäß überführt. Die Zellen wurden fünf Minuten bei 1700 g und 4 °C pelletiert und anschließend in Lysepuffer (PBS + 1 % Triton + 1 mM EDTA, pH 7,4) mit Proteraseinhibitoren resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 15 min bei 4 °C geschüttelt und die Zellen anschließend durch scheren mit Spritzen mit abnehmendem Kanüledurchmesser (0,7 mm, 0,55 mm, 0,4 mm) aufgeschlossen. Zuletzt wurden die Zelllysate für 15 min bei 4 °C schüttelnd inkubiert und dann 15 min bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration des klaren Überstandes wurde mit der BCA Methode (siehe 5.4.2) bestimmt und 50 µg Protein wurde als Inputkontrolle separiert. Zur Avidinbindung wurde die Menge an Proteinlysate die einer Menge von 1 mg Protein entsprach mit 90 µl Avidinbeads (Pierce) auf einem Drehrad bei 4 °C für drei Stunden inkubiert. Die Avidin-Biotin-Proteinkomplexe wurden durch Zentrifugation für zwei min bei 5000 g pelletiert. Zum Entfernen von ungebundenem Protein wurden die Pellets mit Lysepuffer (+ 0,25 mM NaCl) gewaschen, anschließend in zweifach Laemmli resuspendiert, fünf min bei 95 °C denaturiert und via SDS- Gelelektrophorese analysiert.

5.5 Rekombinante DNA Technologien

5.5.1 Polymerase Ketten Reaktion (PCR; polymerase chain reaction)

Die PCR ist eine Methode mit der innerhalb kurzer Zeit geringe Mengen an DNA, theoretisch genügt ein DNA-Molekül, so stark vervielfältigt werden, dass sie problemlos nachgewiesen, untersucht oder weiterbehandelt werden können. Die PCR Reaktion beruht auf einem immer wiederkehrenden Zyklus aus nur drei Schritten (siehe Abbildung 5). Im ersten Schritt werden die DNA Stränge, die die Zielsequenz enthalten und vervielfältigt werden sollen, bei 95 °C denaturiert, d.h. die doppelsträngige DNA zerfällt durch Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen in zwei Einzelstränge. Durch Herabsetzen der Temperatur auf etwa 55 °C hybridisieren zu bestimmten DNA-Bereichen komplementäre Primer mit der DNA. Die Primer flankieren den DNA Bereich, welcher amplifiziert werden soll. Im dritten Schritt, bei etwa 72 °C, verlängert eine thermostabile DNA-Polymerase die Primersequenzen homolog zur DNA durch Anhängen einzelner Nukleotide. Im nächsten Zyklus nun steht nicht nur die Anfangs-DNA zur Vervielfältigung zur Verfügung, sondern auch die bereits gebildeten DNA-Fragmente, so dass nach nur 20 Zyklen aus einem DNA- Molekül theoretisch über eine Million Amplifikate entstehen können. Die Spezifität der PCR Reaktion definiert sich durch die Annealing- Temperatur für die Primer und die Puffer Bedingungen. Die Annealing Temperatur von Primern kann man durch den Einsatz folgender Formel berechnen:

$$T_m(^{\circ}C) = 2 * Anzahl(A + T) + 4 * Anzahl(G + C)$$

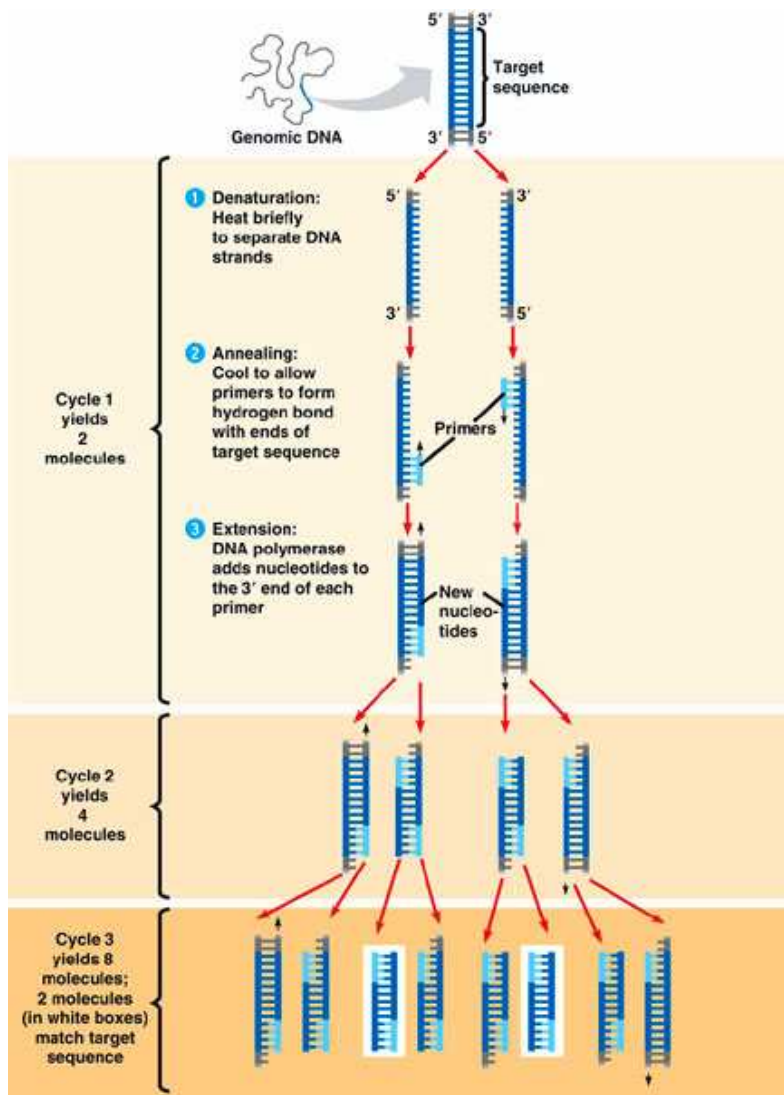


Abbildung 5: Ein Überblick über die Schritte und Abläufe in der PCR (Abbildung aus <http://schoolworkhelper.net/wp-content/uploads/2011/06/PCR1.jpg>). Dargestellt sind die drei Schritte der PCR Reaktion: Denaturierung, Primeranheftung (Annealing) und Primerverlängerung (Elongation). Deutlich zu sehen ist die stetige Vermehrung der Zielsequenz (target sequence) mit jedem weiteren PCR-Zyklus.

Die Standardzusammensetzung für eine Phusion PCR war wie folgt:

1 µl	Template DNA
2,5 µl	Primer Oligonukleotid vorwärts (100 pmol/µl)
2,5 µl	Primer Oligonukleotid rückwärts (100 pmol/µl)
10 µl	5 x High Fidelity Puffer
1 µl	dNTPs (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0,5 µl	Phusion DNA-Polymerase
32,5 µl	H ₂ O

Das Standard Protokoll zur Amplifikation war wie folgt:

95 °C	30 s	1 Zyklus
95 °C	10 s	} 20 – 40 Zyklen
T _m (56 – 58 °C)	30 s	
72 °C	20 s/Kb	
72 °C	10 min	1 Zyklus
4 °C	∞	

5.5.2 Quick change site directed mutagenesis PCR

Zur Einführung von einzelnen Punktmutationen in ein Gen nutzt man die Quick change PCR. Bei dieser speziellen Form der PCR werden komplementäre Primer, die beide die entsprechende Mutation enthalten, verwendet. Diese binden an die Wildtyp-DNA und werden im Schritt der Elongation verlängert, so dass als Produkt das gesamte Plasmid mit der Mutation entsteht. Dieses neue Produkt steht im nächsten Zyklus wieder als Template zur Amplifikation bereit.

Die Standardzusammensetzung für eine Quick change PCR war wie folgt:

1 µl	Template DNA (30 – 50 ng/µl)
1,1 µl	Primer Oligonukleotid vorwärts (100 pmol/µl)
1,1 µl	Primer Oligonukleotid rückwärts (100 pmol/µl)
10 µl	5 x High Fidelity Puffer
1 µl	dNTPs (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0,5 µl	Phusion DNA-Polymerase
35,5 µl	H ₂ O

Das Standard Protokoll zur Amplifikation war wie folgt:

95 °C	30 s	1 Zyklus
95 °C	10 s	} 12 - 18 Zyklen
55 °C	30 s	
68 °C	20 s/Kb	
4 °C	∞	

Die parentale Wildtyp-DNA wurde anschließend durch das Enzym DpnI abgedaut, welches lediglich methylierte und hemimethylierte DNA erkennt und schneidet. Die mutierte DNA wurde dann in kompetente E.coli XL1-Blue Zellen via Hitzeschock transformiert. Diese Bakterien besitzen einen DNA- Reperaturmechanismus und ligieren so die DNA- Strangenden. Die DNA wurde von Bakterien präpariert, die auf Selektionsplatten gewachsen waren, und anschließend sequenziert.

5.5.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine sehr effiziente Methode um innerhalb kurzer Zeit sehr viele Klone darauf zu testen, ob das Plasmid, das sie durch Transformation aufgenommen haben, das Insert von Interesse in der richtigen Orientierung trägt. Hierzu wird ein Vorwärtsprimer komplementär zur 5' Region des Inserts und ein Rückwärtsprimer komplementär zur 3' Vektorsequenz gewählt. Ein PCR Produkt entsteht nur dann, wenn das Insert in der richtigen Orientierung im Vektor sitzt.

Hierzu wurden auf Selektionsplatten gewachsene Kolonien zunächst nummeriert und beschriftet. Mit einer gelben Eppendorf Pipettenspitze wurde jeweils die Hälfte der Kolonie gepickt und in ein entsprechend nummeriertes PCR Gefäß im PCR Reaktionsmix resuspendiert. Nach der PCR Reaktion wurde die DNA durch Agarose- Gelelektrophorese im Gel aufgetrennt. Wenn eine Bande mit der richtigen Größe detektiert werden konnte, so wurde mit dem entsprechenden Klon eine Vorkultur angesetzt, d.h. es wurden 5 ml LB Medium mit dem entsprechenden Antibiotika versetzt, mit dem Klon angeimpft und über Nacht bei 37 °C hochgezogen.

Die Standardzusammensetzung für eine Kolonie-PCR war wie folgt:

1,5 µl	Primer Oligonukleotid vorwärts (100 pmol/µl)
1,5 µl	Primer Oligonukleotid rückwärts (100 pmol/µl)
3 µl	10 x PCR Puffer
0,6 µl	dNTPs (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0,6 µl	Taq DNA-Polymerase
22,8 µl	H ₂ O
	+ die Hälfte der gepickten Kolonie als Template DNA

Das Standard Protokoll zur Amplifikation war wie folgt:

98 °C	5 min	1 Zyklus
98 °C	30 s	} 24 - 27 Zyklen
58 °C	30 s	
72 °C	1 min/Kb	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

5.5.4 qRT-PCR (Quantitative Reverse Transkriptase-PCR)

Die qRT-PCR dient dem Nachweis der Genexpression spezifischer Gene in bestimmten Zellen oder ganzen Geweben auf mRNA Ebene und verknüpft zwei molekularbiologische Methoden miteinander: die Reaktion der Reversen Transkriptase und die Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (Real time PCR). Um die Transkription eines Gens nachweisen zu können, muss die entsprechende mRNA untersucht werden. Da die meisten Polymerasen allerdings keine RNA vervielfältigen können, wird die RNA zunächst durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA (c = complementary) umgeschrieben, und diese cDNA dann als Template in eine gewöhnliche PCR Reaktion eingesetzt. Die vervielfältigte DNA kann anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt, analysiert und quantifiziert werden.

5.5.4.1 RNA Isolation

Zur Isolation der RNA wurden die Zellen geerntet und das Zellpellet in 800 µl Trizol Reagenz (Life Technologies, 15596-026) aufgenommen. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform wurde die Zellsuspension 15 min bei 4 °C und 12000 g abzentrifugiert. Die wässrige Phase des Überstandes enthält die RNA und wurde in ein frisches Gefäß überführt. Zur Maximierung der RNA Ausbeute wurde standardmäßig 0,5 µg Glycogen zu der Zellsuspension gegeben. Die RNA wurde mit 1 ml Isopropanol zehn Minuten gefällt und danach zehn Minuten bei 4 °C und 12000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol (in DEPC, Diethylpyrocarbonat, behandeltem Wasser) gewaschen. Das RNA Pellet wurde anschließend kurz getrocknet, um die Überreste des Ethanols verdampfen zu lassen, und dann in 10 µl Wasser aufgenommen. Zur Überprüfung der RNA- Isolationseffizienz konnte eine Verdünnung der Probe (1 µl Probe+ 49 µl Wasser) im Photometer untersucht werden und/oder eine Probe (1 µl) auf ein Agarosegel aufgetragen werden.

5.5.4.2 DNase Verdau

Um eventuelle Verunreinigungen der RNA Probe mit genomischer DNA zu eliminieren, wurde die RNA Probe mit dem Enzym DNase (Life Technologies, 18068-015) nach Herstellerangaben behandelt.

1 µg	RNA
1 µl	10 x DNase I Reaktionspuffer
1 µl	DNase I
7 µl	DEPC behandeltes Wasser

5.5.4.3 Reverse Transkription

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde ein Reaktionsmix mit dem Enzym Reverse Transkriptase (Superscript II, Life Technologies) angesetzt.

RNA Probe	1 µg
OligodT (0,5 µg/µl)	1 µl
dNTP (10 mM in DEPC H ₂ O)	1 µl
DEPC H ₂ O	auf 12 µl auffüllen
→ 5 min, 65 °C	
5 x Erststrangpuffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNase out	1 µl
→ 2 min, 42 °C	
Superscript II	1 µl
→ 50 min, 42 °C 15 min, 70 °C ∞ 4 °C	

5.5.4.4 Quantitative PCR (Real time PCR)

Der QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit enthält folgende Komponenten:

- HotStarTaq DNA Polymerase
- QuantiTect SYBR Green PCR Puffer
- dNTP Mix mit dUTP
- SYBR Green I
- ROX (Referenzfarbstoff)
- 5 mM MgCl₂

Dem Reaktionsmix wird ein DNA- interkalierender Farbstoff (in diesem Fall SYBR Green) zugegeben, welcher sich in die DNA Doppelstränge einlagert und fluoresziert. So wird nach jeder Elongationsphase die Fluoreszenz bestimmt, welche proportional mit der Menge des PCR- Produktes zunimmt. Die Quantifizierung des DNA- Produktes erfolgt dann in der exponentiellen Phase der PCR. Das Gerät bestimmt einen so genannten Cq- Wert (cycle threshold), der angibt, zu welchem Zeitpunkt die Fluoreszenzintensität in der Probe über einen bestimmten Schwellenwert steigt. Die Cq- Werte der zu untersuchenden Proben werden immer auf Referenzgene, wie z.B. RNA- Polymerase oder TATA Box binding Protein (TBP), normalisiert.

Die Standardzusammensetzung für eine qRT-PCR war wie folgt:

12,5 µl	QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit
2,5µl	Primer 1 (100 pmol/µl)
2,5 µl	Primer2 (100 pmol/µl)
0,5 µl	cDNA
7 µl	H ₂ O

Das Standard Protokoll zur Amplifikation war wie folgt:

95 °C	15 min	1 Zyklus
95 °C	30 s	} 44 Zyklen
53 °C	30 s	
72 °C	30 s	
95 °C	30 s	
4 °C	∞	

5.5.5 Umklonierung

5.5.5.1 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind in Bakterien zur Phagenabwehr natürlich vorkommende Enzyme. Jede Endonuklease erkennt eine bestimmte Konsensussequenz, d.h. Abfolge von meist sechs bis acht DNA-Basen in einer speziellen Reihenfolge, an die sie bindet und den DNA-Doppelstrang dort schneidet. Als „molekulare Scheren“ bezeichnet, spielen diese Enzyme eine wichtige Rolle in der Molekularbiologie. Sie ermöglichen es durch geschickte Kombination von ein oder mehreren Endonukleasen ganz definierte Bereiche, z.B. ein Gen, aus einem Vektor herauszuschneiden und in einen anderen wieder zu ligieren, d.h. Umklonierungen zu vollziehen. Es gibt drei Typen von Restriktionsendonukleasen mit unterschiedlicher Aktivität und Spezifität. Manche dieser Enzyme bilden glatte (blunt), andere sogenannte überhängende (sticky) Enden.

Im Allgemeinen wurden Verdünnungen mit 0,5 – 4 µg des gewünschten DNA-Fragments in einem totalen Volumen von 30 µl mit 1 µl des Enzyms im entsprechenden Puffer gemischt. Die Temperatur und Dauer der Inkubation richteten sich nach den Anweisungen des Herstellers.

5.5.5.2 Alkalische Phosphatase: Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierungsreaktion mit der alkalischen Phosphatase wird im Anschluss an Endonuklease Reaktionen, die glatte Enden entstehen lassen, durchgeführt. Das Entfernen der Phosphatreste an der Schnittstelle verhindert z.B., dass ein geschnittener Vektor ohne das gewünschte Insert religiert.

Die Standardzusammensetzung für eine Dephosphorylierungsreaktion war wie folgt:

30 µl	geschnittener Vektor
4 µl	10 x Antarctic Phosphatase Puffer
2 µl	Antarctic Phosphatase
4 µl	H ₂ O

Der Reaktionsmix wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend wurde die Antarctic Phosphatase fünf Minuten bei 65 °C inaktiviert. Zur Aufreinigung des Vektorfragments wurde die GTQ-Gelelektrophorese oder die Alkohol Präzipitation benutzt.

5.5.5.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Um kompatible Enden von DNA-Fragmenten und linearisierten Vektoren zusammen zu fügen werden DNA-Ligasen benutzt. Diese Enzyme sind in der Anwesenheit von Magnesium und ATP in der Lage Phosphor-Diester Bindungen zwischen dem 5'Phosphat- und dem 3'Hydroxyl- Ende zweier DNA-Fragmente zu bilden.

Die Standardzusammensetzung für eine Ligation war wie folgt:

x µl	Insert DNA-Fragment
y µl	Vektor-DNA
1,5 µl	10 x T4 DNA Ligase Puffer
1 µl	T4 DNA Ligase
auf 15 µl	H ₂ O

Der Reaktionsmix wurde über Nacht bei 4 °C oder alternativ vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die gesamte DNA-Menge im Reaktionsmix betrug etwa 200 ng und das Verhältnis von Insert zu Vektor wurde bei Blunt End Ligationen bei 1:1 und bei Sticky End Ligationen bei 6:1 gehalten.

5.5.6 Agarose Gelelektrophorese

Die Agarose Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, um Nukleinsäuren zu identifizieren, zu isolieren oder aufzureinigen. Agarose ist ein Polysaccharid aus roten Meeresalgen, welches sich beim Erhitzen in TBE-Puffer löst. Beim Abkühlen vernetzen sich die Agarosefäden zu doppelhelikalen Strukturen, die ein dreidimensionales Netzwerk ausbilden, dessen Porengröße von der verwendeten Agarosekonzentration abhängt. Im elektrischen Feld wandern negativ geladene Nukleinsäuren durch die Agarosematrix vom Minus (Anode)- zum Pluspol (Kathode) und werden folglich ihrer Größe und ihrer Ladung nach aufgetrennt. Kleine Nukleinsäuren laufen hierbei schneller als Große.

Die verwendete Agarosekonzentration, und damit die Größe der Poren im Agarosegel, richtete sich nach der Größe der zu trennenden DNA Fragmente. Normalerweise wurden 0,5 bis 2 %-ige Gele benutzt, um DNA Fragmente zwischen 0,05 und 10 Kb aufzutrennen. Für analytische Zwecke wurde die Multipure Agarose (Roth) verwendet, während die GTQ-Agarose (Cambrex) mit ihrem niedrigen Schmelzpunkt für präparative Gele besser geeignet ist. Zur Herstellung der Gele wurde die entsprechende Menge an Agarose mit einfach TBE Puffer gemischt und in einer Mikrowelle solange erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Zur Visualisierung der DNA nach der Auftrennung, wurde der Agarosesuspension 0,001 mg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Diese interkalierende Substanz lagert sich in die Doppelhelix der DNA ein und kann durch Bestrahlung mit UV Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht werden. Nach Aushärten der Agarose wurde das Gel in einer Elektrophoresekammer in einfach TBE Laufpuffer platziert. Die DNA-Proben wurden mit Glycerol-haltigem Ladepuffer gemischt, der die DNA in die Taschen absinken lässt und die Lauffront färbt. Zur Identifikation der Größe der Probenbestandteile wurde auf jedes Gel auch ein kommerziell erhältlicher DNA-Größenstandard mit aufgetragen.

10 x TBE Puffer, pH 8,0	
0,89 M	Tris-HCl
0,89 M	Borsäure
0,02 M	EDTA

10 x Ladepuffer	
40 % (w/v)	Harnsäure
40 % (w/v)	Glycerol
50 mM	EDTA, pH 8,0
10 mM	Tris-HCl, pH 7,0
0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
0,25 % (w/v)	Xylencyanol FF

5.5.7 Gelextraktion

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus GTQ-Gelen wurde das QiaQuick Gel Extraction Kit nach Herstelleranweisung benutzt. Hierzu wurden die Banden von Interesse aus dem Gel ausgeschnitten, die Agarose bei 50 °C gelöst und die DNA über eine Säule aufgereinigt. Die DNA konnte dann direkt für weitere Klonierungsschritte eingesetzt werden.

5.5.8 Herstellung von chemisch kompetenten *E.coli* Zellen

Als Kompetenz bezeichnet man die Fähigkeit von Bakterien Fremd-DNA aufzunehmen. Nur wenige Bakterienarten wie z.B. *Streptococcus pneumoniae* oder *Haemophilus influenzae* verfügen über natürliche Kompetenz, d.h. das Genom dieser Bakterien enthält die so genannten com-Gene. Diese Gene kodieren Proteine, die für die Erkennung von DNA, deren Aufnahme und die Integration in das Genom durch Rekombination verantwortlich sind. Das Darmbakterium *E.coli* verfügt über keine natürliche Kompetenz, kann aber durch die Behandlung mit Calcium- oder Magnesiumionen chemisch kompetent gemacht werden.

Hierzu wurde eine 5 ml LB Vorkultur mit einer einzelnen Kolonie XL-1 Blue angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 ml dieser Kultur in 100 ml LB Medium überführt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ (optische Dichte bei 600 nm) von ~0,5 wachsen gelassen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation mit 6000 g und bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 5-10 ml eiskaltem TSS Puffer resuspendiert und als 100, 200 oder 300 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der TSS Puffer ist ein Ca²⁺-reicher Puffer, der die Aufnahme von Plasmiden in die Zelle erleichtert. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei – 80 °C. Um die Kompetenz, d.h. die

Transformierbarkeit, der Zellen zu bestimmen, wurde eine Test Transformation mit einem Plasmid bekannter Konzentration durchgeführt. Von drei verschiedenen Verdünnungen der Zellen (1:10, 1:100, 1:1000) wurden jeweils 100 µl der Bakteriensuspension auf LB Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert. Die Zellen konnten 24 h bei 37 °C wachsen und anschließend bestimmte man die Kompetenz mit der folgenden Gleichung:

$$\text{Kompetenz} = \text{Anzahl Kolonien} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \frac{\text{Gesamt Vol}}{\text{ausplattiertes Vol}} \times \frac{1}{\text{Plasmid in } \mu\text{g}}$$

Die Zellen wurden als kompetent bezeichnet, wenn die Transformationseffizienz im Bereich von 10^6 : 10^7 cfu (colony forming units)/µg DNA war.

TSS Puffer	
10 %	Polyethylenglycol (PEG) 3350
50 mM	MgCl ₂
5 %	DMSO
auf 50 ml	LB-Medium

5.5.9 Hitzeschocktransformation von Plasmiden in chemisch kompetente Bakterienzellen

Als Transformation bezeichnet man die nicht-virale Übertragung freier DNA in kompetente Zellen, wie z.B. Bakterienzellen. Hierzu gibt es zwei grundlegende Methoden: der Hitzeschock und die Elektroporation. Beim Hitzeschock werden chemisch kompetente Zellen mit Calciumchlorid behandelt, welches die abstoßenden Kräfte zwischen negativ geladener Zellmembran und DNA minimiert. Durch kurzfristige Erhöhung der Temperatur auf 42 °C bilden sich Poren in der Zellmembran durch die die DNA in die Zelle wandern kann. Bei der Elektroporation hingegen wird die Zellmembran durch einen kurzen elektrischen Schock bei 2000-2500 V geöffnet.

In der vorliegenden Arbeit wurden die chemisch kompetenten *E.coli* Zellen mit Hilfe des Hitzeschocks transformiert. Hierzu wurden die Zellen ganz langsam auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA für 20 – 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 90 sec in einen Heizblock bei 42 °C gestellt und dann wieder zwei Minuten auf Eis platziert, damit die Membran sich wieder schließen konnte. Vor dem Ausplattieren wurden die Zellen in 1 ml LB Medium aufgenommen und 60 min bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. 100 µl der Bakteriensuspension wurden dann auf eine Agarplatte mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.5.10 Isolierung von Plasmid DNA

5.5.10.1 Mini-Präparation

Hatten sich einzelne Bakterienkolonien nach z.B. Kolonie-PCR (siehe 5.5.3) als potentiell richtige Klone herausgestellt, so wurden diese amplifiziert. Hierzu wurden zunächst 5 ml LB Vorkulturen

der gewünschten Bakterienklone unter Antibiotikaselektion über Nacht bei 37 °C herangezogen. Für die Plasmid Präparationen bis zu 20 µg DNA wurde das Qiaprep Spin Mini Isolations-Kit (Qiagen) nach Herstelleranweisung verwendet. Die QIAprep Spin Mini Säulen enthalten eine Silicagelmembran, die die DNA in der Anwesenheit hoher Konzentrationen von chaotropen Salzen bindet und anschließend die Elution der DNA in kleinem Volumen Puffer ermöglicht. Um nun Zellpellets zu erhalten wurden 1,5 ml, bei low copy Plasmiden 3 ml, der Vorkulturen fünf Minuten bei 1844 g abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 250 µl Puffer mit RNase Inhibitoren resuspendiert und mit 250 µl Lysepuffer gemischt. Um RNA und Proteine zu präzipitieren wurden 350 µl Neutralisierungspuffer hinzu gemischt. Der Mix wurde anschließend zehn Minuten bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Die Plasmid DNA befand sich nun im Überstand und wurde über eine Säule aufgereinigt. Mit einem Spektralphotometer wurde die Absorption einer Probenverdünnung (1 µl DNA + 49 µl H₂O) bei 260 nm und 280 nm gemessen und somit die Menge und Reinheit der aufgereinigten DNA bestimmt. Die DNA konnte anschließend zur Sequenzierung oder Restriktionskartierung eingesetzt werden.

5.5.10.2 Maxi-Präparationen

Wenn sich rekombinante DNA nach Sequenzierung (siehe 5.5.11) als korrekt erwiesen hat, so wurde die DNA mit Hilfe von Bakterien amplifiziert und in großem Maßstab für weitere Anwendungen aufgereinigt. Hierzu wurden zunächst 200 – 400 µl von 5 ml LB über Nacht Kulturen der gewünschten Bakterienklone in 400 ml LB Medium überführt und 12 – 15 h bei 37 °C herangezogen. Für die Plasmid Präparationen bis zu 750 µg DNA wurde das HiSpeed Maxi Kit (Qiagen) nach Herstelleranweisung verwendet. Das Protokoll entspricht dem der Mini-Präparation, wobei die Menge der verwendeten Lösungen und Puffer entsprechend angepasst wurde.

5.5.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung rekombinanter DNA wurde von der Firma Seqlab Sequence in Göttingen durchgeführt.

5.6 Fura 2AM-basierende Calciumkonzentrationsbestimmungen

Die Methode der Calciummikrofluorometrie ermöglicht es die Calciumionenkonzentration von Geweben oder einzelnen Zellen zu bestimmen und zu untersuchen. Ein wichtiges Werkzeug dieser Technik sind Ca²⁺-sensitive Fluorophore. Dabei handelt es sich um Farbstoffe, die ihre Emissionswellenlänge bei gegebener Anregungswellenlänge verändern, sobald sie Ca²⁺ gebunden haben (Burchiel, Edwards et al. 2000). Weit verbreitet sind zum einen die Einzelwellenlängenindikatoren wie z.B. Fluo-3 und zum anderen die ratiometrischen Calciumindikatoren wie z.B. Indo-1 oder Fura 2. Da die Zellmembran für die meisten der bekannten Fluorophore eine unüberwindbare Barriere darstellt, müssen diese mikroinjiziert oder in Membran durchlässige Esterformen umgewandelt werden. Das Fura 2AM (Acetoxymethylester) –Molekül stellt eine solche Esterform des Farbstoffs dar. In dieser Form können die Fluorophore die Zellmembran überqueren und werden anschließend durch cytosolische Esterasen gespalten. Dabei entsteht Formaldehyd, Acetat und die Säureform des Farbstoffes, die nun als Indikator fungiert. Das Fura 2 Molekül (siehe Abbildung 6) verbindet ein fluoreszierendes Stilben-Chromophor mit den, durch die charakteristische Tetracar-

boxylatstruktur hervorgerufenen, Komplexierungseigenschaften der Ca^{2+} -Chelatoren EGTA und BAPTA. Durch die EGTA-Grundstruktur erhält Fura 2 eine von der Ionengröße abhängende Kationenselektivität, die für Calciumionen sehr viel höher liegt als für Magnesiumionen. Die Calciumaffinität ist sehr günstig für physiologische Messungen, da die Dissoziationskonstante mit etwa $0,25 \mu\text{M}$ im Bereich intrazellulärer Calciumionenkonzentrationen von Säugerzellen ($0,1 - 1 \mu\text{M}$) liegt (Grynkiewicz, Poenie et al. 1985). Zudem kann mit Fura 2 eine starke Fluoreszenzintensität erreicht werden, so dass die Zellen mit einer relativ niedrigen Farbstoffkonzentration beladen werden können. Das Messprinzip beruht darauf, dass ein Fura 2-Molekül, wenn es an Ca^{2+} gebunden vorliegt, bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm ein Absorptionsmaximum besitzt, während es, wenn es kein Ca^{2+} gebunden hat, maximal bei etwa 380 nm absorbiert. Als Maß für die intrazelluläre Calciumionenkonzentration gilt der Quotient aus den Fluoreszenzintensitäten (F_{340}/F_{380}), die bei den beiden Anregungswellenlängen emittiert werden. Darum bezeichnet man eine solche Form von Fluorophor auch als ratiometrisch. Die Bindung von Ca^{2+} verschiebt das Maximum der gemessenen Intensität um etwa 40 nm zu kürzeren Wellenlängen.

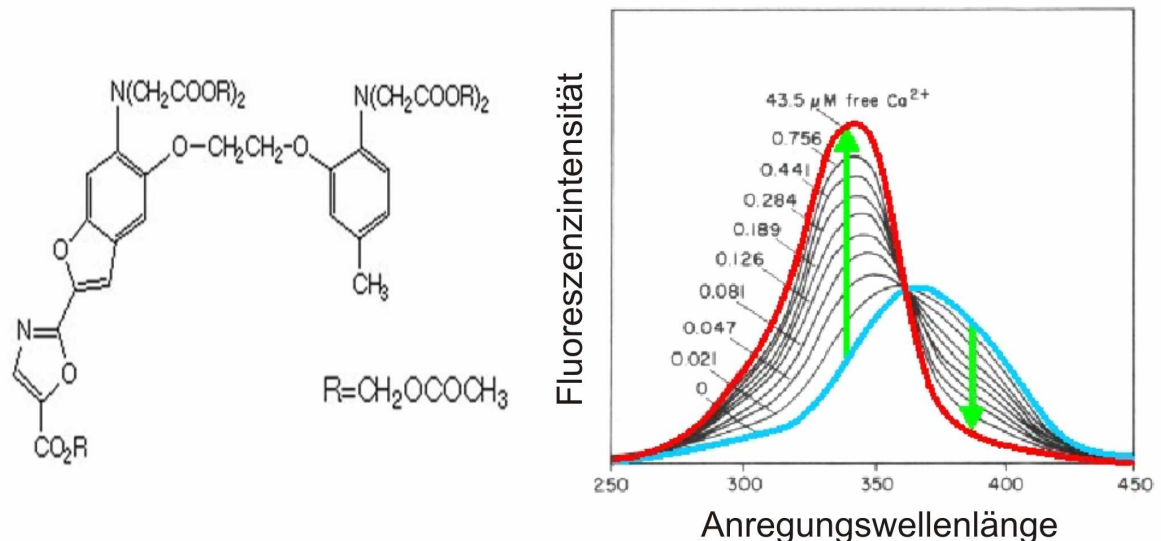


Abbildung 6: Strukturformel und Anregungsspektrum für das Fura 2 Molekül. **A** Strukturformel des Fura-2-Moleküls. Das Fura-2 Molekül bindet Ca^{2+} mit vier Carboxylgruppen (ganz oben): Fura-2 ist ein Ca^{2+} -Chelator. Die Stilbengruppe (unten) ist der Chromophor des Moleküls. **B** Anregungsspektrum von Fura-2 für verschiedene Calciumionenkonzentrationen. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität, gemessen bei 510 nm für Anregungswellenlängen jeweils im Bereich zwischen 250 nm und 450 nm . Die Fluoreszenz ändert sich sowohl mit der Wellenlänge des Anregungslichts als auch mit der Calciumionenkonzentration. In Ca^{2+} -freier Lösung wird ein Spektrum mit einem Maximum bei 380 nm gemessen. Bei hoher Calciumionenkonzentration verschiebt sich das Maximum zu 340 nm . Nur bei 360 nm , dem isosbestischen Punkt, ist die Fluoreszenz unabhängig von der Calciumionenkonzentration.

Die Emission von Fura 2 wird von der Calciumbindung nur unwesentlich beeinflusst und erreicht zwischen 505 nm und 520 nm das Maximum. Die Intensität des Fluoreszenzlichtes (F_{340}) wird bestimmt durch:

$$(1) F_{340} = c * d * K * f[(\text{Ca}^{2+})]$$

c die Konzentration des Farbstoffes

d die Dicke der Zelle

K eine Konstante, die die optischen Eigenschaften der Messapparatur zusammenfasst
 $f([Ca^{2+}])$ die Calciumionenkonzentration

Da c , d und K nicht bekannt sind, ist es nicht möglich die Calciumionenkonzentration alleine aus der Intensität des Fluoreszenzlichtes (F_{340}) zu berechnen. Hier hilft die Eigenschaft von Fura 2, auf Anstieg der Calciumionenkonzentration mit einem Anstieg der Fluoreszenzintensität bei 340 nm (F_{340}) und einem Abfall der Fluoreszenzintensität bei 380 nm (F_{380}) zu reagieren. D.h. es kommt zur Verschiebung des Anregungsspektrums des Fluoreszenzfarbstoffes Fura 2 beim Binden von Ca^{2+} als Ligand. Da man davon ausgehen kann, dass sich die Unbekannten c , d und K zwischen zwei unmittelbar aufeinander folgenden Messungen bei 340 nm bzw. 380 nm nicht ändern, kann durch die Bildung des Quotienten F_{340}/F_{380} (Ratio-Wert) eine experimentell bestimmbare Messgröße ermittelt werden, die lediglich noch von der Calciumionenkonzentration abhängt.

$$(2) \quad \frac{F_{340}}{F_{380}} = \frac{c * d * K * f([Ca^{2+}])}{c * d * K * f([Ca^{2+}])}$$

Dieser Quotient ermöglicht die Messung absoluter Calciumionenkonzentrationen in lebenden Zellen, unabhängig von Farbstoffkonzentration und Zellform.

In der vorliegenden Studie wurden HEK293 Zellen nach Transfektion auf 25 mm Glas-Deckgläschen kultiviert und mit 1 μ M Fura 2AM in MEM Medium für 20 min im Brutschrank inkubiert. Jurkat T-Zellen und primäre $CD4^+$ T-Zellen wurden als Suspension mit derselben Fura 2AM Konzentration in RPMI bzw. AIMV Medium 30 min bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler geladen. Die T-Zellen wurden anschließend auf Poly-Ornithin beschichteten Deckgläschen gesetzt. Zur Untersuchung von SOCE in den Fura 2 basierenden Calciumimaging Experimenten wurde das sogenannte Ca^{2+} -readdition Protokoll (siehe Abbildung 7) benutzt. Hierzu wurde die von Fura 2AM ausgehende Fluoreszenz innerhalb der Zellen zunächst für 100 s in Ca^{2+} -haltiger Lösung gemessen, anschließend wurden die Zellen mit einer Ca^{2+} -freien Lösung perfundiert und die Änderungen in der Fluoreszenz für weitere 300 s gemessen, um das basale Ca^{2+} der Zellen zu bestimmen. Die Speicher wurden durch Zugabe von 1 μ M Thapsigargin (Tg) in Ca^{2+} -freier Lösung entleert (1000 s) und dann konnte der Calciumeinstrom über Kanäle in der Plasmamembran nach Perfusion mit Ca^{2+} -haltiger Lösung bestimmt werden (600 s). Ein aussagekräftiger Wert bei dieser Messung ist die Calciumeinstromrate nach Wechsel auf die Ca^{2+} -haltige Lösung mit Tg. Die Einstromrate wird wesentlich durch die Aktivität der speicheraktivierten Calcium-Kanäle in der Membran bestimmt.

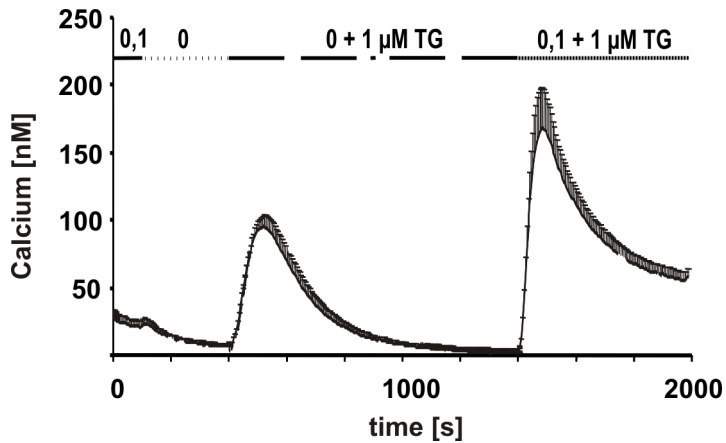


Abbildung 7: Ca^{2+} - Readdition Protokoll zur Untersuchung von speicheraktivierten Calciumströmen in Fura 2 basierenden Calciumimagingexperimenten. Die Zellen befinden sich zu Beginn der Messung für 100 s in einer 0,1 mM Ca^{2+} -Lösung. Anschließend werden die Zellen mit einer Ca^{2+} -freien Lösung perfundiert und weitere 300 s gemessen. Die Speicher werden durch Zugabe von 1 μM Thapsigargin (TG) in Ca^{2+} -freier Lösung entleert (1000 s) und DNA wird der Ca^{2+} einstrom über Kanäle in der Plasmamembran nach Perfusion mit 0,1 mM Ca^{2+} -haltiger Lösung bestimmt (600 s).

Mittels der TILL Vision Software ist die Belichtung der Probe gesteuert und die Änderungen in der Fluoreszenzintensität aufgezeichnet worden. Alle 5 s erfolgte zunächst die Belichtung mit 340 nm und direkt danach mit 380 nm Anregungswellenlänge. Die Belichtungszeit bei den Experimenten mit den HEK293 Zellen betrug 50 ms, während die Messungen der Jurkat T-Zellen und der primären T-Zellen mit 25 ms Belichtungszeit durchgeführt wurden. Das Anregungslicht wurde durch einen Polychrom IV Monochromator generiert. Die Ca^{2+} - abhängige Emission des Farbstoffes von Licht der Wellenlänge 520 nm wurde mit einer CCD (charge coupled decive) Kamera aufgenommen.

Als Eichung oder Kalibration bezeichnet man folglich die Bestimmung des Zusammenhangs zwischen Messwerten und Ergebnissen. Die allgemein gebräuchliche Formel zur Bestimmung der Calciumionenkonzentration aus gemessenen Fluoreszenzintensitäten stammt von Tsien und Kollegen:

$$(3) \quad [\text{Ca}^{2+}] = K_d \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \left(\frac{F_{f380}}{F_{b380}} \right)$$

K_d Dissoziationskonstante; für Fura 2 bei 37 °C = 224 nM

R Ratio-Wert, Quotient aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei 340 und 380 nm

R_{\min} Ratio-Wert ohne Ca^{2+}

R_{\max} Ratio-Wert bei maximaler Calciumionenkonzentration

F_{f380} Fluoreszenzintensität von freiem Fura 2

F_{b380} Fluoreszenzintensität von Ca^{2+} -gebundenem Fura 2

Durch die Kalibration mussten nun die Parameter R_{\min} und R_{\max} ermittelt werden. Hierzu wurden Zellen zunächst mit Fura 2AM geladen. Die Zellen befanden sich auf Deckgläsern in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -haltiger Lösung. Zur Bestimmung des R_{\min} Wertes wurden die Zellen für eine Stunde in einer

Ca²⁺-freien Lösung mit 1 mM EGTA, 1 µM Thapsigargin und 4 µM Ionomycin inkubiert. Nach der Inkubation wurde zunächst die Fluoreszenz der Zellen in der Ca²⁺-freien Lösung bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm (F₃₄₀) bzw. bei 380 nm (F₃₈₀) gemessen, um R_{min} zu berechnen. Anschließend wurde eine Ca²⁺-haltige Lösung (20 mM CaCl₂, kein EGTA) auf die Zellen gegeben. Aus den unter diesen Bedingungen gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei 340 nm (F₃₄₀) bzw. 380 nm (F₃₈₀) konnte R_{max} berechnet werden.

$$(4) \quad R_{\min} = \frac{F_{f340}}{F_{f380}}; \text{ in Ca}^{2+}\text{-freier Lösung}$$

$$(5) \quad R_{\max} = \frac{F_{b340}}{F_{b380}}; \text{ in Ca}^{2+}\text{-haltiger Lösung (20 mM CaCl}_2\text{)}$$

Nach Einsetzen der Werte in Gleichung (1) konnte nun die Calciumionenkonzentration für jede beliebige Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Die Kalibration musste für jeden Zelltyp und nach jeder Änderung an dem Messplatz wiederholt werden.

Die Aufnahme der Messungen, sowie die Analyse der Fluoreszenzwerte, erfolgte mit dem Programm TillVision. Zur Analyse wurden für die Zellen sogenannte ROI's (Region of interest) bestimmt und das Programm bestimmte die Änderung der Fluoreszenzintensitäten über die Zeit. Durch Platzierung der ROI's in zellfreie Bereiche konnte die Hintergrundfluoreszenz bestimmt werden, welche später von den Messwerten subtrahiert wurde. Die Umrechnung der 340/380 Ratio Werte erfolgte mit dem Programm IgorPro, für die graphische Darstellung der Ergebnisse und die Statistik wurde das Programm Microsoft Excel benutzt.

Ca ²⁺ - freie Lösung, pH 7,4		Ca ²⁺ - haltige Lösung, pH 7,4	
Substanz	Konzentration (mM)	Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	155	NaCl	155
KCl	4,5	KCl	4,5
Glucose	10	Glucose	10
Hepes	5	Hepes	5
MgCl ₂	3	MgCl ₂	x
EGTA	1	CaCl ₂	y

Die Konzentrationen von CaCl₂ und MgCl₂ wurden immer so angepasst, dass die Gesamtkonzentration dieser divalenten Ionen bei 3 mM lag. Den Lösungen wurde je nach Bedarf Thapsigargin (in DMSO, 1 mM Stocklösung) in der Endkonzentration 1 µM zugesetzt.

Ca ²⁺ -freie Lösung zur Kalibration, pH 7,4		Ca ²⁺ -haltige Lösung zur Kalibration, pH 7,4	
Substanz	Konzentration (mM)	Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	155	NaCl	155
KCl	4,5	KCl	4,5
Glucose	10	Glucose	10
Hepes	5	Hepes	5
MgCl ₂	3	MgCl ₂	2
EGTA	1	CaCl ₂	20
Thapsigargin	0,001		
Ionomycin	0,004		

5.7 TIRF-Mikroskopie (Total internal reflection fluorescence- Mikroskopie)

Die TIRF-Mikroskopie ist eine spezielle Methode der Lichtmikroskopie mit der man fluoreszierende Proben lediglich in der Nähe des Deckglases, bis zu 250 nm tief in die Probe hinein, beobachten kann. Es wird die Tatsache ausgenutzt, dass Licht, das in einem flachen Winkel auf eine Grenzfläche zwischen optisch dichtem (z.B. Deckglas) und weniger dichtem (z.B. Salzlösung) Medium trifft, reflektiert wird. Dadurch entsteht in dem weniger dichten Medium ein evaneszentes Feld, d.h. ein Lichtfeld, das exponentiell in die Probe hinein abfällt. Die typische Eindringtiefe für sichtbares Licht liegt im Bereich von etwa 100 – 200 nm. Befinden sich nun Moleküle innerhalb des evaneszenten Feldes, welche die eingestrahlte Wellenlänge absorbieren können, so werden diese zum Fluoreszieren angeregt. Der große Vorteil dieser Methode liegt in der verbesserten Auflösung in der z-Achse, wobei die Untersuchungen auch auf diesen Bereich beschränkt sind. Man erhält keine Emissionen aus tieferen Bereichen innerhalb der Probe und verbessert somit das Signal- zu Rausch-Verhältnis.

In der vorliegenden Arbeit wurde die TIRF-Mikroskopie zur Anwendung gebracht, um das Clustering von STIM1 Molekülen im ER in Plasmamembran-nahen Regionen zu untersuchen. Hierzu wurden HEK293 Zellen mit N-YFP getaggtten STIM1 und/ oder C-RFP getaggtten Orai1 Konstrukten transfiziert (Fugene), 24 h nach Transfektion auf 25 mm Glas-Deckgläser gesplittet und weitere 24 h später untersucht. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Um die Clusteringgeschwindigkeit von STIM1WT und STIM1DQ in An- oder Abwesenheit von C-RFP Orai1 vergleichen zu können, wurden die Deckgläser in eine Perfusionskammer eingebaut und mit Ca²⁺-haltiger Ringerlösung gewaschen. Dann startete die Messung, wobei jede Sekunde eine Belichtung mit dem 488 nm Laser erfolgte. Nach 20 s wurden die Zellen mit Ca²⁺-freier Ringerlösung und Thapsigargin (1 µM) gespült, um das Clustering zu induzieren. Die Aufnahme erfolgte über einen Zeitraum von insgesamt zehn Minuten. Analysiert wurde anschließend die Zunahme der Fluoreszenzintensität in der TIRF-Ebene gegen die Zeit, wobei die Hintergrundfluoreszenz abge-

zogen wurde. Um die Kollokalisierung der STIM1 und Orai1 Cluster zu untersuchen wurden die Zellen zunächst für 10 Minuten in Ca^{2+} -freier Lösung inkubiert. Anschließend wurden Aufnahmen von denselben Zellbereichen zuerst mit dem 561 nm und danach mit dem 488 nm Laser gemacht. Für die Auswertung wurden willkürlich 10 ROI (region of interest) pro Zelle in die RFP Aufnahmen gesetzt und dann die gleichen ROI in den GFP Aufnahmen analysiert.

Der verwendete Messplatz besteht aus einem Leica AM TIRF MC System mit einem 100x 1,47 NA Oil HCX PlanApo Objektiv. Das System ist mit einem 561 nm und einem 488 nm Laser ausgestattet, die in Verbindung mit einem RFP- oder GFP-Filter benutzt wurden. Zur Aufnahme der Fluoreszenz wurde die gekühlte CCD (charge coupled device) Kamera Andor iXon 885 benutzt. Die Belichtungszeiten betrugen zwischen 100 und 300 ms. Der TIRF- Winkel wurde an jedem Messtag mit der Autoalignment-Funktion von Leica kalibriert und die Eindringtiefe betrug für alle Messungen zwischen 110 und 150 nm. Zur Auswertung wurde die Leica LAS Software verwendet.

Ca^{2+} - freie Lösung, pH 7,4		Ca^{2+} - haltige Lösung, pH 7,4	
Substanz	Konzentration (mM)	Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	155	NaCl	155
KCl	4,5	KCl	4,5
Glucose	10	Glucose	10
Hepes	5	Hepes	5
MgCl_2	3	MgCl_2	2
EGTA	1	CaCl_2	1

5.8 Förster Resonanzenergietransfer (FRET)

Der Förster-Resonanzenergietransfer ist eine Methode um Protein-Protein Interaktionen zu untersuchen. Im Vergleich zur Co-Immunopräzipitation z.B. bietet die FRET Methode die Möglichkeit der zeitlichen Auflösung der Reaktionen im Millisekundenbereich. Die Methode beruht auf der strahlungslosen Energieübertragung, deren Grundlagen im Jahr 1948 erstmals von Theodor Förster beschrieben wurden. Der Energietransfer kann bei Farbstoffen beobachtet werden, wobei die Energie nicht in Form eines Photons vom Donor zum Akzeptor übertragen wird, sondern strahlungslos als Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, und folgt somit dem Coulomb-Gesetz. Die auf den Akzeptorfarbstoff übertragene Energie kann dann wiederum in Form von Strahlung abgegeben werden. Voraussetzung für FRET ist, dass Donor und Akzeptor in räumlicher Nähe auftreten, d.h. höchstens 10 nm voneinander entfernt sind. Die Effizienz des Energietransfers ist proportional zu dem Kehrwert des Abstandes von Donor und Akzeptor zur sechsten Potenz. Zudem muss das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen (siehe Abbildung 8).

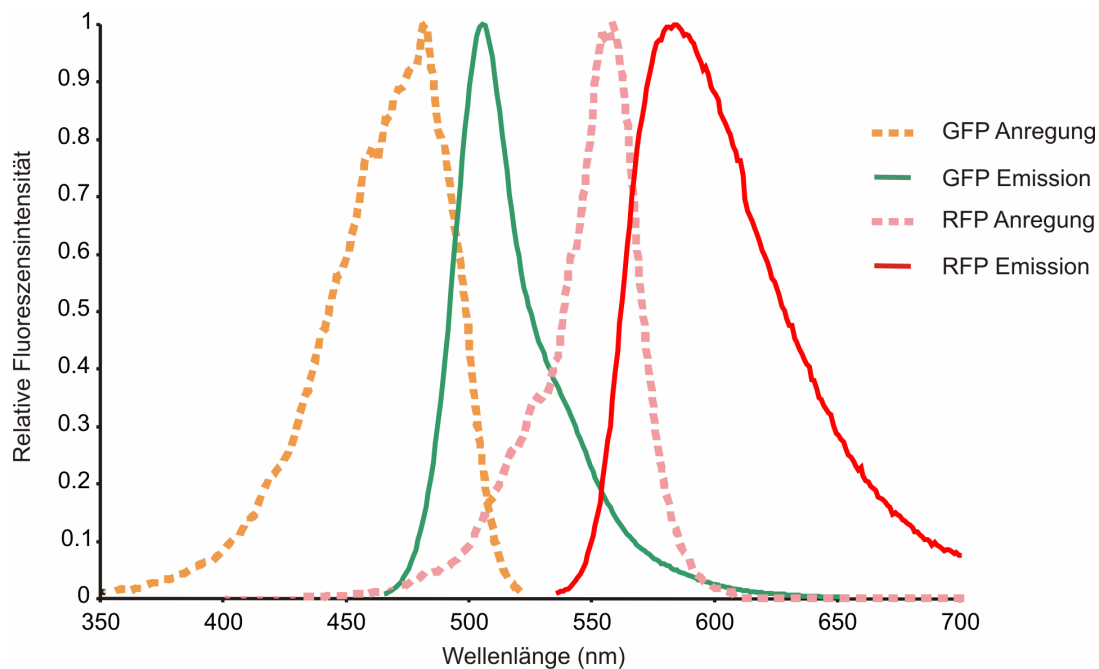


Abbildung 8: Anregungs- und Emissionsspektren von GFP und RFP. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der Protein-Protein Interaktion die FRET Methode zur Anwendung gebracht. Die beiden Proteine, deren Interaktion untersucht werden sollte, wurden mit den Fluoreszenzproteinen GFP bzw. RFP direkt gekoppelt. Bei der Betrachtung der Spektren wird deutlich, dass die Fluoreszenzproteine GFP und RFP ein mögliches FRET-Paar darstellen, da das Emissionsspektrum von GFP mit dem Anregungsspektrum von RFP überlappt. GFP wird maximal mit gelbem Licht der Wellenlänge ~ 470 nm angeregt und emittiert grünes Licht der Wellenlänge ~ 510 nm. RFP wird mit Licht der Wellenlänge ~ 560 nm maximal angeregt und emittiert rotes Licht der Wellenlänge 600 nm. Der Wellenlängenbereich in dem das GFP Emissions- und das RFP Absorptionsspektrum überlappen wird für FRET benötigt.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Energietransfer zwischen den Molekülen STIM1 und Orai1, wie in Abbildung 9 dargestellt, bzw. zwischen STIM1 und STIM1 nach Speicherentleerung mit Tg untersucht werden. Zur Analyse der STIM1-Orai1-Interaktion wurden HEK293 Zellen mit STIM1WT-RFP bzw. STIM1DQ-RFP und Orai1-GFP transfiziert und 48 h nach Transfektion untersucht. Im Falle der STIM1-STIM1 Interaktion wurden die HEK293 Zellen mit gleichen Anteilen STIM1RFP und STIM1GFP transfiziert. Die Speicherentleerung wurde durch 10 minütige Inkubation in einer Ca^{2+} -freien Lösung mit 1 μM Tg induziert. Anschließend wurde das FRET Signal in der TIRF Ebene aufgenommen. Für jede Zelle wurden drei Aufnahmen innerhalb weniger Millisekunden gemacht. Zuerst wurde die Probe mit dem 488 nm Laser angeregt und die Emission durch den GFP Filter gemessen, um die Stärke des Donorsignals zu bestimmen. Dann wurden die Zellen mit dem 561 nm Laser bestrahlt und die Emission durch den RFP Filter gemessen, um die Effizienz des Akzeptorsignals bei optimaler Anregung zu bestimmen. Und schließlich wurde die gleiche Zelle mit dem 488 nm Laser angeregt, allerdings die Emission durch den RFP Filter bestimmt. Dieses Signal entsprach somit dem FRET Signal.

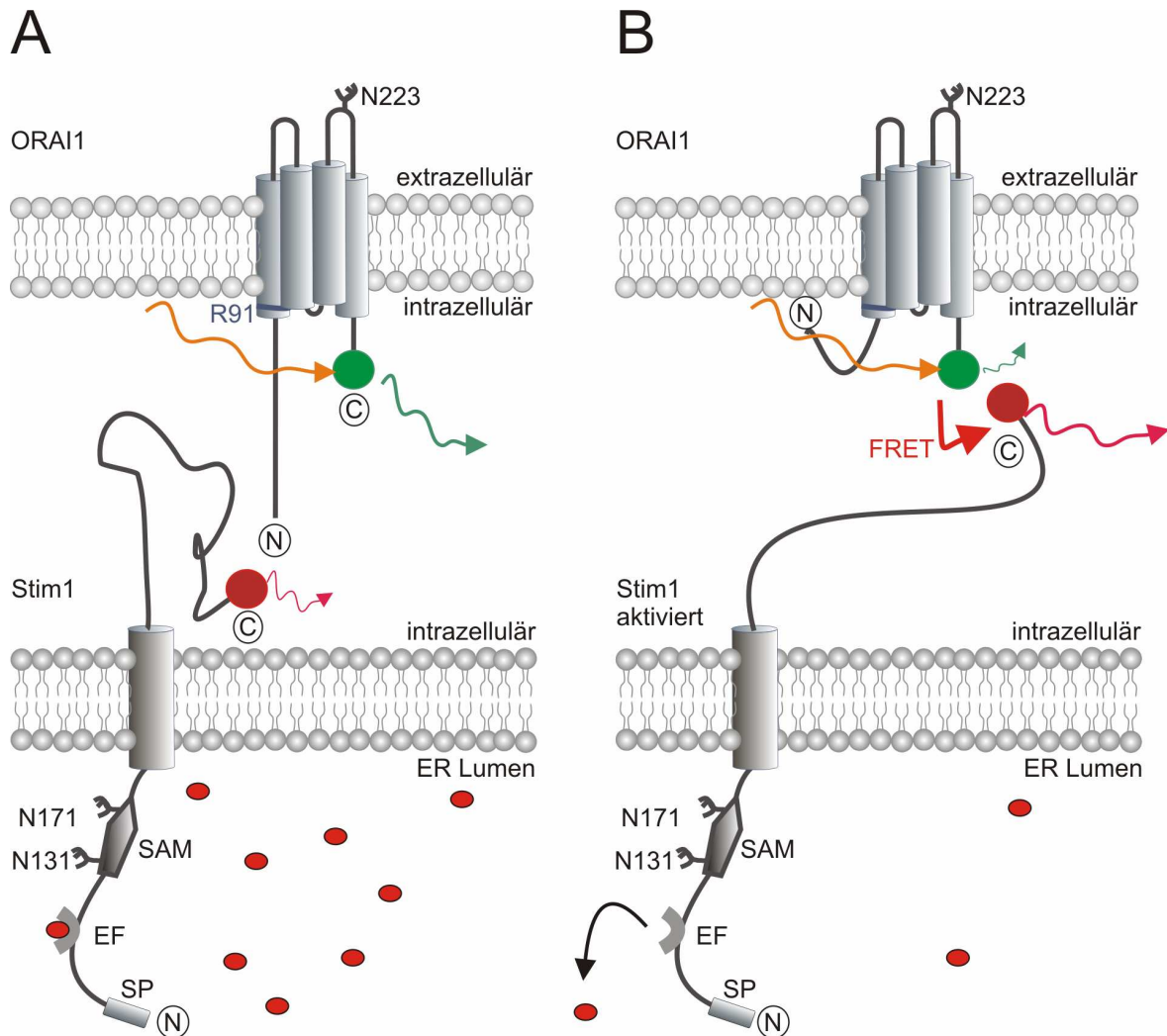


Abbildung 9: Anwendung der FRET-Technik zur Untersuchung der STIM1-Orai1 Proteininteraktion. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der Protein-Protein Interaktion die FRET Methode zur Anwendung gebracht. Das STIM1 Protein wurde mit RFP und das Orai1 Protein mit GFP am C-Term gekoppelt. **A** Solange die Speicher mit Ca^{2+} gefüllt sind, befinden sich die C-Terme der Proteine in zu großer Entfernung zueinander, so dass nach Bestrahlung der Probe mit Licht der Wellenlänge 488 nm lediglich grünes Licht der Wellenlänge 510 nm von GFP emittiert wird. **B** Induziert man allerdings die Speicherentleerung mit Tg so verändert das STIM1 Protein seine Konformation und rückt näher zu Orai1 um dieses zu aktivieren. Regt man nun die Probe mit Licht der Wellenlänge 488 nm an, so nimmt das GFP die Energie auf, überträgt die Energie auf das räumlich nahe gelegene RFP Molekül, und man misst emittiertes Licht der Wellenlänge 590 nm.

Der verwendete Messplatz besteht aus einem Leica AM TIRF MC System mit einem 100x 1,47 NA Oil HCX PlanApo Objektiv. Das System ist mit einem 561 nm und einem 488 nm Laser ausgestattet, die in Verbindung mit einem RFP- oder GFP-Filter benutzt wurden. Zur Aufnahme der Fluoreszenz wurde die gekühlte CCD (charge coupled device) Kamera Andor iXon 885 benutzt. Die Belichtungszeiten betrugen 200 ms. Der TIRF- Winkel wurde an jedem Messtag mit der Autoalignment-Funktion von Leica kalibriert und die Eindringtiefe betrug für alle Messungen 150 nm. Zur Aufnahme der FRET Signale wurde die Leica FRET SE Wizard Software verwendet. Die Korrekturfaktoren zur Korrektur des Crosstalks von einem in den anderen Kanal wurden an jedem Messtag individuell bestimmt. Hierzu wurden Zellen lediglich mit einem Konstrukt für Donor oder Akzeptor transfiziert. Im Falle der Donorprobe regte man das Fluorophor GFP mit dem 488 nm Laser an und berechnete wieviel Prozent des Signals im GFP-, RFP- oder FRET-Emissionskanal zu

sehen waren. Ebenso wurde die RFP-Akzeptorprobe mit dem 561 nm Laser bestrahlt und die Signale in den drei Kanälen bestimmt. So konnte das Programm automatisch die Korrekturfaktoren α , β , γ , δ berechnen.

$$\begin{aligned} \alpha &= A / C \\ \beta &= B / A \\ \gamma &= B / C \\ \delta &= A / B \end{aligned} \quad (6)$$

A, B, C Intensität des Signals im Donor-, FRET- und Akzeptorkanal

α , β , γ , δ Korrekturfaktoren

Zur Berechnung des normalisierten FRET Signals wurde folgende Formel nach Van Rhee et al verwendet:

$$(7) \quad E_{(A)} i = \frac{B - A * \beta - C * (\gamma - \alpha * \beta)}{C * (1 - \beta * \delta)}$$

Zudem wurden alle Bilder auf den Hintergrund korrigiert.

Ca ²⁺ -freie Lösung, pH 7,4	
Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	155
KCl	4,5
Glucose	10
Hepes	5
MgCl ₂	3
EGTA	1
Thapsigargin	0,001

5.9 Elektrophysiologie: Patch-clamp

Die elektrophysiologische Forschung wurde im Jahr 1976 von Neher und Sakmann durch die Entwicklung der Patch-clamp Technik revolutioniert. Mit dieser Methode lassen sich Ionenströme durch Ionenkanäle in der Membran einzelner Zellen messen, deren Stromgröße nur wenige Picoampere (10^{-12} Ampere) beträgt. Abgeleitet wurde die Patch-clamp Methode von der Technik der

Spannungsklemme, die bereits in den 1930er Jahren zur Bestimmung von Strömen in intakten Nervenzellen entwickelt wurde. Hierzu werden zwei Elektroden in die Zelle gestochen: eine dient dazu, die vom Experimentator festgelegte Kommandospannung zu applizieren, während mit der anderen Elektrode die resultierenden Ströme über die Membran gemessen werden können. Somit wird die Gesamtheit aller Einzelströme über die Membran gemessen, die genaue Erforschung einzelner Ionenkanäle ist mit dieser Methode nicht möglich. Das Grundprinzip der Spannungsklemme wurde deshalb in der Patch-clamp Technik weiterentwickelt und verfeinert. Der Begriff Patch clamp kommt aus dem Englischen und bedeutet einen „Membranfleck“ auf ein bestimmtes Potential „festklemmen“. Die Elektrode wird nicht mehr in die Zelle gestochen, sondern besteht aus einer ausgezogenen, stumpfen Glaskapillare, die mit physiologischer Lösung gefüllt ist und in die ein mit Silberchlorid beschichteter Silberdraht taucht, und wird lediglich auf die Zelloberfläche aufgesetzt. Die Öffnung der Glaskapillare beträgt lediglich 1 – 2 μm . Durch Anlegen eines leichten Unterdruckes an das Ende der Glaskapillare wird eine Verbindung zwischen Membran und Pipette erzeugt, wodurch zwischen dem Inneren der Pipette und der Außenlösung ein elektrischer Widerstand in der Größenordnung von mehr als einem Gigaohm, der so genannte Gigaseal, entstehen kann. Diese Anordnung bezeichnet man nun als cell-attached Konfiguration. Durch weiteres Anlegen von kurzen Unterdruckpulsen am Ende der Pipette kann der Patch geöffnet werden, während der Gigaseal intakt bleibt. Dadurch diffundiert die Pipettenlösung in das Cytosol und Ströme über die gesamte Zellmembran können abgeleitet werden, da der Stromkreislauf durch eine so genannte Badelektrode in der Außenlösung geschlossen wird. Diese Anordnung bezeichnet man als whole-cell Konfiguration (siehe Abbildung 10) und ermöglicht durch die Zusammensetzung der physiologischen Lösung in der Kapillare die Zelle von innen zu manipulieren.

In der vorliegenden Studie wurden alle Patch-clamp Messungen in der whole-cell Konfiguration durchgeführt und mit einem EPC-10 Patch-clamp Verstärker mit der entsprechenden HEKA Software Patchmaster aufgezeichnet. Zur Aktivierung des CRAC- Stroms wurde der internen Lösung deshalb IP_3 zugegeben, welches die IP_3 -Rezeptoren in der ER Membran direkt aktivierte und somit eine schnelle Entleerung des ER zur Folge hatte. Die interne Lösung enthielt zudem eine bestimmte Menge (10 – 20 mM) eines Ca^{2+} Chelators, welcher die in die Zelle einströmenden Ca^{2+} Ionen direkt binden konnte und dadurch die Ca^{2+} abhängige Inaktivierung des CRAC Kanals verhinderte. Alternativ enthielt die interne Lösung nur einen Ca^{2+} -Chelator, wie z.B. Bapta oder EGTA, welche das aus dem ER leckende Ca^{2+} binden kann, das Auffüllen der Speicher verhindert und somit den CRAC Strom „passiv“ auslösten.

Die Glaskapillaren bestanden aus Borsilikat und wurden in einem 3 Schritt- Verfahren mit einem DMZ Horizontalpuller hergestellt und poliert. Zur Beschichtung wurden die gefüllten Pipetten in Sigmacote (Sigma) eingetaucht. Eine Beschichtung (coating) der Pipetten mit hydrophoben Substanzen führt man durch, um die Wandstärke der Pipettenspitze zu vergrößern und somit die Kapazität zu verringern. Gleichzeitig wird dadurch verhindert, dass sich ein langer Wasserfilm am Schaft der Pipette hochzieht, der ebenfalls das kapazitative Rauschen erhöhen würde. Je nach Fragestellung wurden verschiedene Lösungen und Protokolle verwendet. Zur Analyse wurde die Fit-Master Software verwendet, die graphische Darstellung und Statistik wurde mit den Programmen IgorPro und Microsoft Excel durchgeführt.

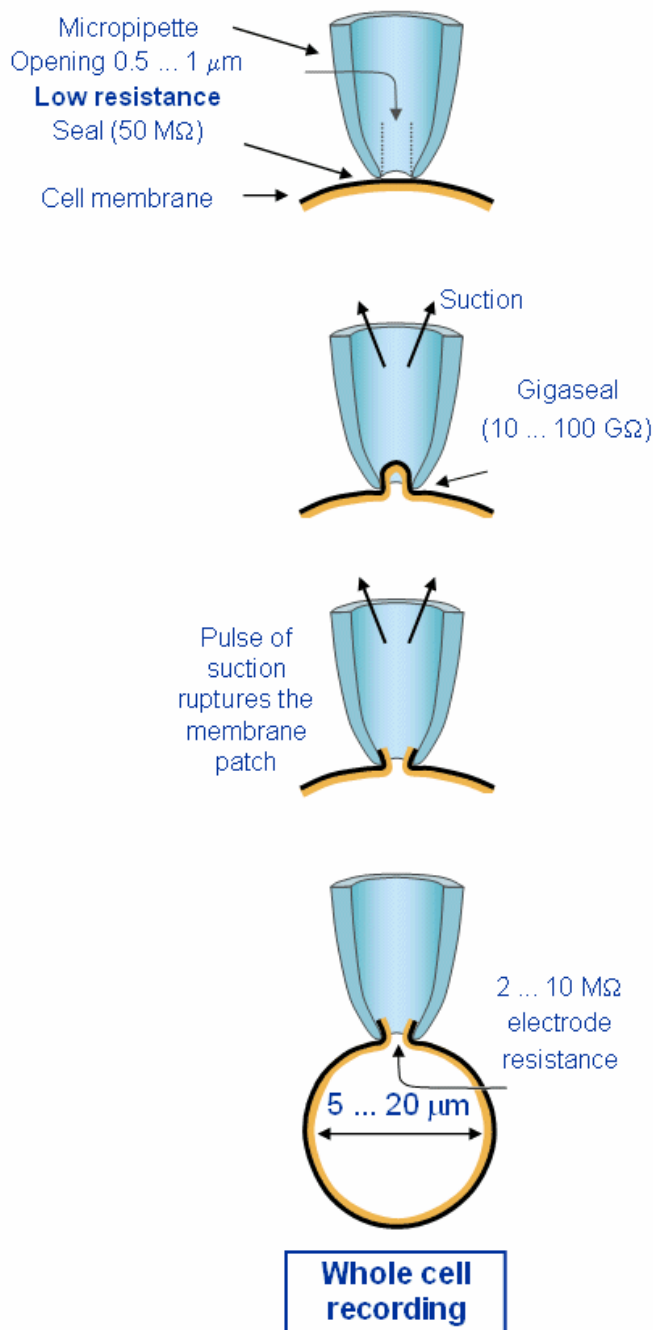


Abbildung 10: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte zum Erhalt der whole cell Patch-clamp Konfiguration (Abbildung aus <http://shermanlab.uchicago.edu/images/patchingwholecell.bmp>). Zunächst wird die mit physiologischer Lösung gefüllte Glaspipette auf die Zelle aufgesetzt. Durch Anlegen eines Unterdruckes am oberen Ende der Pipette bildet sich eine feste Verbindung zwischen Zellmembran und Pipette aus, der so genannte Gigaseal. Durch kurze Unterdruckpulse kann der Membranbereich unter der Pipette geöffnet werden, wobei der Gigaseal erhalten bleibt. Die whole-cell Patch-clamp Konfiguration ermöglicht die Ableitung von Ionenströmen durch Kanäle über die gesamte Zellmembran.

5.9.1 Das Rampen-Protokoll

Um so genannte Strom-Spannungs-Kennlinien für einen bestimmten Ionenkanal zu erhalten, d.h. den Zusammenhang zwischen dem Membranpotential und dem Strom über die Membran herzustellen, werden so genannte Rampen-Protokolle benutzt. Direkt nach dem Einbruch in die Zelle werden lineare Spannungsrampen von z.B. -150 mV bis +150 mV appliziert und die resultierenden

Ströme über die Membran aufgezeichnet. Die Strom-Spannungs-Kennlinien zeigen für jeden Ionenkanal eine charakteristische Form, die von der Rektifizierung, der Selektivität und der Leitfähigkeit des Kanals für bestimmte Ionen und der ionalen Zusammensetzung der extrazellulären Lösung abhängt.

Zur Untersuchung von I_{CRAC} wurden in der vorliegenden Arbeit mit Orai1- und STIM1-Konstrukten kotransfizierte HEK293 Zellen, sowie Jurkat T-Zellen elektrophysiologisch untersucht. Das Protokoll wurde direkt nach dem Einbruch in die Zelle gestartet und generierte alle 2 s innerhalb von 50 ms lineare Rampen von -150 mV bis +150mV bzw. von -100 mV bis +100 mV. Das Haltepotential zwischen den Rampen betrug 0 mV. Für die großen Ströme im Überexpressionssystem wurde eine Serienwiderstandskompensation (R-series compensation) von 80 % eingestellt. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Analyse wurde die Stromentwicklung gegen die Zeit bzw. die Stromentwicklung in Abhängigkeit von der angelegten Spannung aufgetragen. Für den direkten Vergleich der Stromdichte (CD = current density) von Zellen, wurde die Stromdichte bei einer angelegten Spannung von -130 mV oder -80 mV nach 110 s oder die maximale Stromdichte abgelesen.

Externe Lösung, pH 7,2		Externe Lösung Divalent- frei (DVF), pH 7,2	
Substanz	Konzentration (mM)	Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	120	NaCl	120
TEA-Cl	10	TEA-Cl	10
CaCl ₂	x	Hepes	10
MgCl ₂	2	Glucose	30
Hepes	10	EDTA	10
Glucose	30		
Interne Lösung aktive Depletion, pH 7,2		Interne Lösung passive Depletion, pH 7,2	
Substanz	Konzentration (mM)	Substanz	Konzentration (mM)
Cs-Glutamat	120	Cs-Aspartat	120
MgCl ₂	3	MgCl ₂	3
Cs-Bapta	20	NaCl	8
Hepes	10	Hepes	10
IP ₃	0,05	EGTA	10

5.9.2 Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit (open probability Po)

Der über die gesamte Membran abgeleitete Strom (I) in Patch-clamp Analysen lässt sich durch die folgende Gleichung erklären:

$$(8) \quad I(t) = N_{\gamma} Po(V, t)(V - V_x)$$

N	Anzahl der Kanäle in der Membran
γ	Einzelkanalleitfähigkeit
Po(V, t)	Offenwahrscheinlichkeit des Kanals, als Funktion von Membranpotential und Zeit
V	Membranpotential
V_x	Umkehrpotential des Stroms

In der vorliegenden Studie sollte die relative Offenwahrscheinlichkeit der Orai1 Kanäle in Abhängigkeit von der STIM1 Menge und der verschiedenen STIM1 Mutationen untersucht werden. Nach dem Einbruch in die Zelle wurden zunächst 50 ms Rampen von -150 mV bis +150 mV alle 2 s generiert, bis der Strom maximal aktiviert war. Dann wurde das Puls-Protokoll gestartet. Zunächst wurde für 200 ms ein Testpuls (von +140 mV bis -140 mV) generiert, dem ein 50 ms Puls zu -120 mV folgte. Während des Pulses zu -120 mV wurde ein so genannter Tail-current aufgezeichnet. Um die Amplitude der Tail-currents zu bestimmen, wurden diese mit einer exponentiellen Funktion zum Beginn des -120 mV Pulses gefittet. Zur graphischen Darstellung wurden die Werte der Offenwahrscheinlichkeit gegen die angelegte Spannung des Testpulses aufgetragen. Diese Punkte wurden anschließend mit der Boltzmann- Gleichung gefittet:

$$(9) \quad Po(V) = P_{\min} + \frac{1 - P_{\min}}{1 + \exp((V_{1/2} - V) / k)}$$

Po(V)	Offenwahrscheinlichkeit des Kanals, als Funktion von Membranpotential und Zeit
P_{\min}	Offset
V	Membranpotential
$V_{1/2}$	Halbmaximales Aktivierungspotential
k	Steigungsfaktor

Diese Methode dient dazu die Offenwahrscheinlichkeit relativ zur maximal möglichen Offenwahrscheinlichkeit zu bestimmen.

5.9.3 Bestimmung der Einzelkanalleitfähigkeit durch nicht-stationäre Rauschanalyse (Noise Analysis)

Um die Einzelkanalleitfähigkeit eines Ionenkanals in der Zellmembran bestimmen zu können, muss der gemessene Strom eine bestimmte Mindestgröße haben. Für den Fall des Orai1 vermittelten

Calciumstromes ist diese Bedingung nicht erfüllt, so dass die Einzelkanalleitfähigkeit nicht direkt durch Einzelkanalmessungen zu bestimmen ist. Die nicht-stationäre Rauschanalyse stellt aber eine Methode dar, mit der es über Umwege möglich ist, die Einzelkanalleitfähigkeit des CRAC Kanals zu bestimmen. Als Rauschen oder Noise bezeichnet man hier die Varianz um die mittlere Stromdichte, die dadurch entsteht, dass ständig Kanäle in der Membran geöffnet oder geschlossen werden. Das Rauschen ist demnach dann maximal, wenn die Offenwahrscheinlichkeit 50 % beträgt, und dann minimal, wenn diese 0 % oder 100 % beträgt. Der Zusammenhang zwischen den einzelnen Komponenten lässt sich mit folgenden Gleichungen verdeutlichen:

$$(10) \quad I = iNP_o$$

$$(11) \quad \sigma^2 = Ni^2 P_o(1 - P_o)$$

I	makroskopischer Strom
N	Anzahl unabhängiger Kanäle
i	Stromamplitude
σ^2	Varianz um den Mittelwert
P_o	Offenwahrscheinlichkeit des Kanals

Für eine gemessene Zelle, die idealerweise nur einen Kanaltyp exprimiert, sind in erster Näherung N und i konstant, so dass die Änderungen in I nur durch Änderungen in P_o zustande kommen können. Der Zusammenhang zwischen σ^2 und P_o lässt sich durch eine Parabel verdeutlichen, wobei σ^2 maximal bei $P_o = 0,5$ ist. Trägt man nun σ^2 gegen I auf, so kann man die Punkte mit einer Parabelgleichung fitten, aus der anfängliche Steigung kann i, im Maximum der Parabel N bestimmt werden.

$$(12) \quad \sigma^2 = Ii - I^2 / N$$

Experimentell muss nun eine Bedingung geschaffen werden, wodurch die Offenwahrscheinlichkeit des zu untersuchenden Kanals verändert werden kann. Im Falle des CRAC Kanals kann dies durch Veränderung der Zusammensetzung der externen Lösung erfolgen. CRAC Kanäle von Zellen, die sich in einem normalen physiologischen Medium befinden, sind streng selektiv für den Transport von Calciumionen von außen nach innen. Befinden sich in der externen Lösung keinerlei divalente Ionen, so leitet der CRAC Kanal in großem Maße und einwärtsrektifizierend Na^+ . Wird die Calciumionenkonzentration nun in der Divalent- freien Lösung schrittweise erhöht, so blockieren die Calciumionen immer mehr den Natriumstrom, bis dieser vollständig versiegt. Die Zellen werden also während der Messung mit den verschiedenen externen Lösungen perfundiert. Anschließend bestimmt man die maximale Stromdichte für eine bestimmte Bedingung und trägt diese gegen die Varianz in diesem Punkt auf. Die resultierenden Punkte lassen sich dann durch eine Parabelfunktion fitten und die Einzelkanalleitfähigkeit, sowie die Anzahl aktiver Kanäle in der Membran, können bestimmt werden (Abbildung 11).

Nach dem Einbruch in die Zelle wurden zunächst 50 ms Rampen von -150 mV bis +150 mV alle 2 s generiert, bis der Strom maximal aktiviert war. Dann wurde das Puls-Protokoll gestartet, wo-

durch die Zellen kontinuierlich auf -110 mV gehalten wurden. Zeitgleich wurde die automatisierte Applikation gestartet. Die Zellen wurden im Wechsel 20 Pulse (20 x 200 ms) mit der 2 mM Ca^{2+} externen Lösung und anschließend 60 Pulse (60 x 200 ms) mit einer Divalent-freien Lösung mit definierter Calciumionenkonzentration perfundiert. Die Aufnahmerate während der Applikation mit der 2 mM Ca^{2+} externen Lösung betrug 200 kHz, während die Aufnahmerate bei Perfusion mit der DVF Lösung auf 20 kHz erhöht wurde.

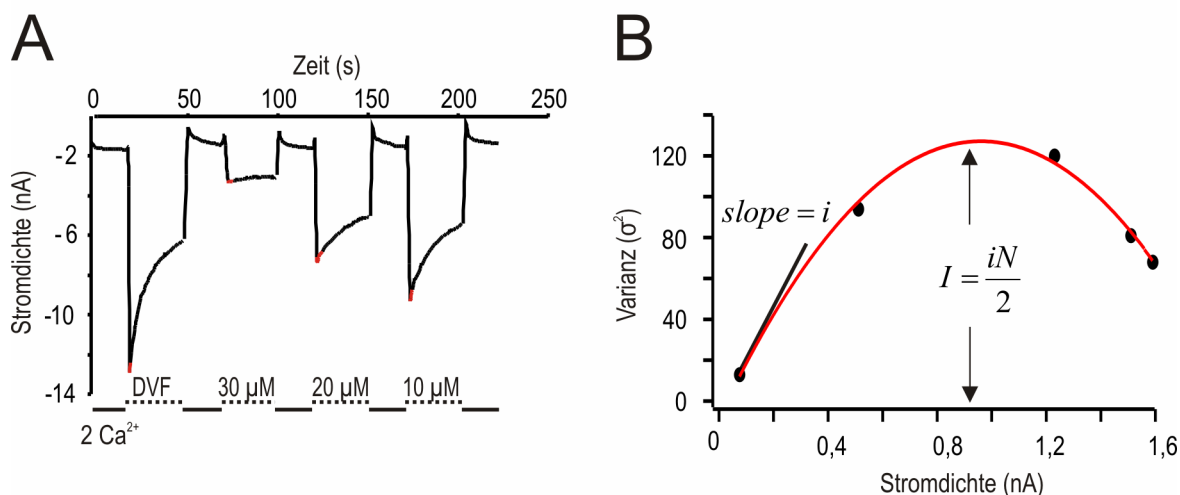


Abbildung 11: Beispielhafte Darstellung der Messung einer Zelle mit dem Pulsprotokoll und Darstellung der resultierenden Parabel nach Fitten der Punkte. **A** Die Zellen wurden im Wechsel 20 Pulse mit der 2 mM Ca^{2+} externen Lösung und dann 60 Pulse mit einer Lösung mit sehr geringer, definierter $[\text{Ca}^{2+}]$ perfundiert. Im linken Graphen aufgetragen ist die Stromdichte gegen die Zeit. Die roten Punkte markieren die Stellen, an denen die maximale Stromdichte und die entsprechende Varianz bestimmt wurden. **B** Im rechten Graphen wurde die Stromdichte in nA gegen die Varianz aufgetragen und die Punkte wurden mit einer Parabelfunktion gefittet. Aus der Parabelgleichung ließen sich die Einzelkanalleitfähigkeit (i) und die Anzahl aktiver Kanäle (N) ablesen.

Zur Analyse wurde zunächst die mittlere Stromdichte während des Pulses gegen die Zeit aufgetragen. Durch die Auftragung der maximalen Stromdichte während der Perfusion mit der Divalent-freien Lösung gegen die dazu entsprechende Varianz in dem Bereich, konnte die zur Ermittlung der Einzelkanalleitfähigkeit notwendige Parabel gefittet werden.

Externe Lösung, pH 7,2		Externe Lösung Divalent- frei (DVF), pH 7,4	
Substanz	Konzentration (mM)	Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	120	NaCl	150
TEA-Cl	10	HEDTA	10
CaCl_2	x	EDTA	1
MgCl_2	2	Hepes	10
Hepes	10	TEA-Cl	10
Glucose	30		

Der pH-Wert der Divalent-freien Lösung wurde mit gelöstem NMDG eingestellt, um die Natriumionenkonzentration nicht zu beeinflussen. Um definierte Calciumionenkonzentrationen in den Lösungen einzustellen, wurde der Divalent-freien Lösung eine bestimmte Menge an CaCl_2 zugegeben. Die entsprechenden Berechnungen für die freie Calciumionenkonzentration wurden mit dem Maxchelator (<http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxcS.htm>) gemacht.

Interne Lösung aktive Depletion, pH 7,2	
Substanz	Konzentration (mM)
Cs-Glutamat	120
MgCl_2	3
Cs-Bapta	20
Hepes	10
IP_3	0,05

5.10 Software

<u>Programm</u>	<u>Anwendungsbereich</u>
Microsoft Office 2002	
Quantity One Version 4.6.5 Build 094	Geldokumentationssystem
Fluor4GENiosPro	Plattenspektralphotometer
TILL Vision v 4.5.64 build 10002	Aufnahme und Auswertung der Fura 2AM basierenden Calciumimagingexperimente
Leica Application suite (LAS) advanced fluorescence 2.4.1 build 6384	Aufnahme und Auswertung der TIRF Messungen
HEKA Patchmaster V2x35, 2008	Aufzeichnung der Patch-clamp Messungen
Heka Fitmaster V2x35, 2008	Auswertung der Patch-clamp Messungen
IGOR Pro 6.04	Auswertung von Experimenten und graphische Darstellung von Ergebnissen
Image Lab 3.0.1 (Bio-Rad)	Darstellung und Quantifizierung von Western Blots

BioRad CFX Manager Version 2	Aufnahme und Auswertung der Quantitativen PCR Reaktionen
Corel Draw X4	Graphische Darstellung von Ergebnissen und Zeichnung von Schemata
Graph Pad Prism5	Graphische Darstellung von Ergebnissen
Zeiss Software AxioVision	Aufnahme und Auswertung immunhistochemischer Färbungen mit dem Cell Observer HS System von Zeiss

6 Ergebnisse

6.1 Tunicamycin verstärkt SOCE und I_{CRAC} in Jurkat T-Zellen

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich der Glykosylierungsgrad einzelner Proteine von T-Zellen, und damit auch deren Funktion, im Laufe des Alterungsprozess verändert (Berger et al, 2006, Plackett et al, 2004, Riley et al, 2005). Möglicherweise besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Glykosylierung, Calciumeinstrommechanismen und T-Zell Funktion. Da sowohl STIM1, als auch Orai1, N-glykosylierte Proteine sind, sollte in der vorliegenden Arbeit nun der Effekt der veränderten Glykosylierungsmuster auf die Calcium-Signale in T-Zellen im Allgemeinen, bzw. auf die CRAC- Kanalaktivität im Speziellen, untersucht werden. In der Literatur sind vergrößerte Calciumsignale nach Behandlung mit Substanzen, die die Zuckerketten schneiden, beschrieben (Cha et al, 2008).

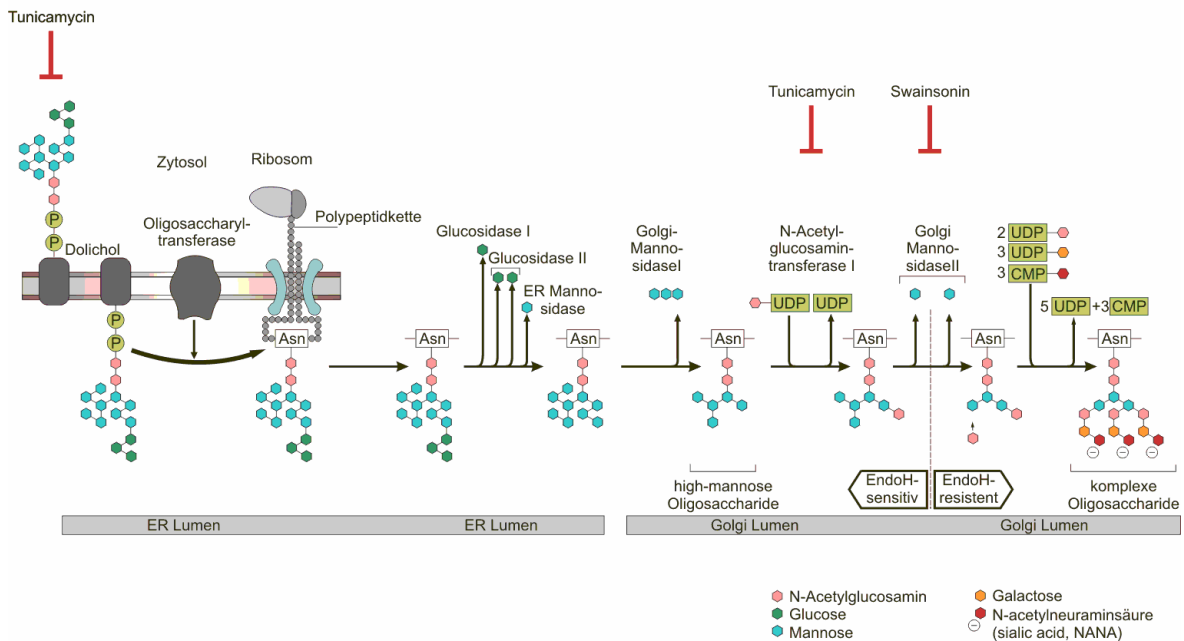


Abbildung 12: Übersichtsskizze über den Ablauf der N- Glykosylierung (Abbildung nachgestellt aus Molecular Biology of the Cell, 4th Edition). Der Prozess startet im ER- Lumen und wird, für komplex glykosylierte Proteine, im Golgi Lumen fortgesetzt. Tunicamycin hemmt den ersten Schritt der Prozesskette und damit den gesamten Ablauf der N- Glykosylierung. Swainsonin hemmt ein Enzym im Golgi Apparat und wirkt daher lediglich auf komplex glykosylierte Proteine, ebenso wie EndoH.

Zunächst sollte nun der Einfluss der Inhibition des gesamten Glykosylierungsprozesses untersucht werden. Hierzu wurden Jurkat T- Zellen mit Tunicamycin behandelt. Tunicamycin hemmt den Transfer von N- Acetylglucosamin-1-Phosphat von UDP- N-Acetylglucosamin auf Dolichol-Phosphat und damit den initialen Schritt der N- Glykosylierung (siehe Abbildung 12). Zudem wurden Zelllysate mit PNGaseF und EndoH behandelt und auf Proteinebene untersucht, um den Glykosylierungstyp von STIM1 und Orai1 zu charakterisieren. Die PNGaseF ist eine Amidase die zwischen N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und Asparaginresten in Zuckerketten N-glykosylierter Proteine schneidet und somit den gesamten Zuckerrest am Protein entfernt. Die Endoglycosidase H (EndoH) schneidet den Kern der Mannosereste und einige hybride Oligosaccharide von N-glykosylierten Zuckerästen, solange diese für das Enzym frei zugänglich vorliegen. Die EndoH Sensitivität geht im medialen Golgi verloren. Werden Proteine im Golgi Lumen vollständig prozessiert, d.h. komplex glykosyliert, sind diese EndoH resistent.

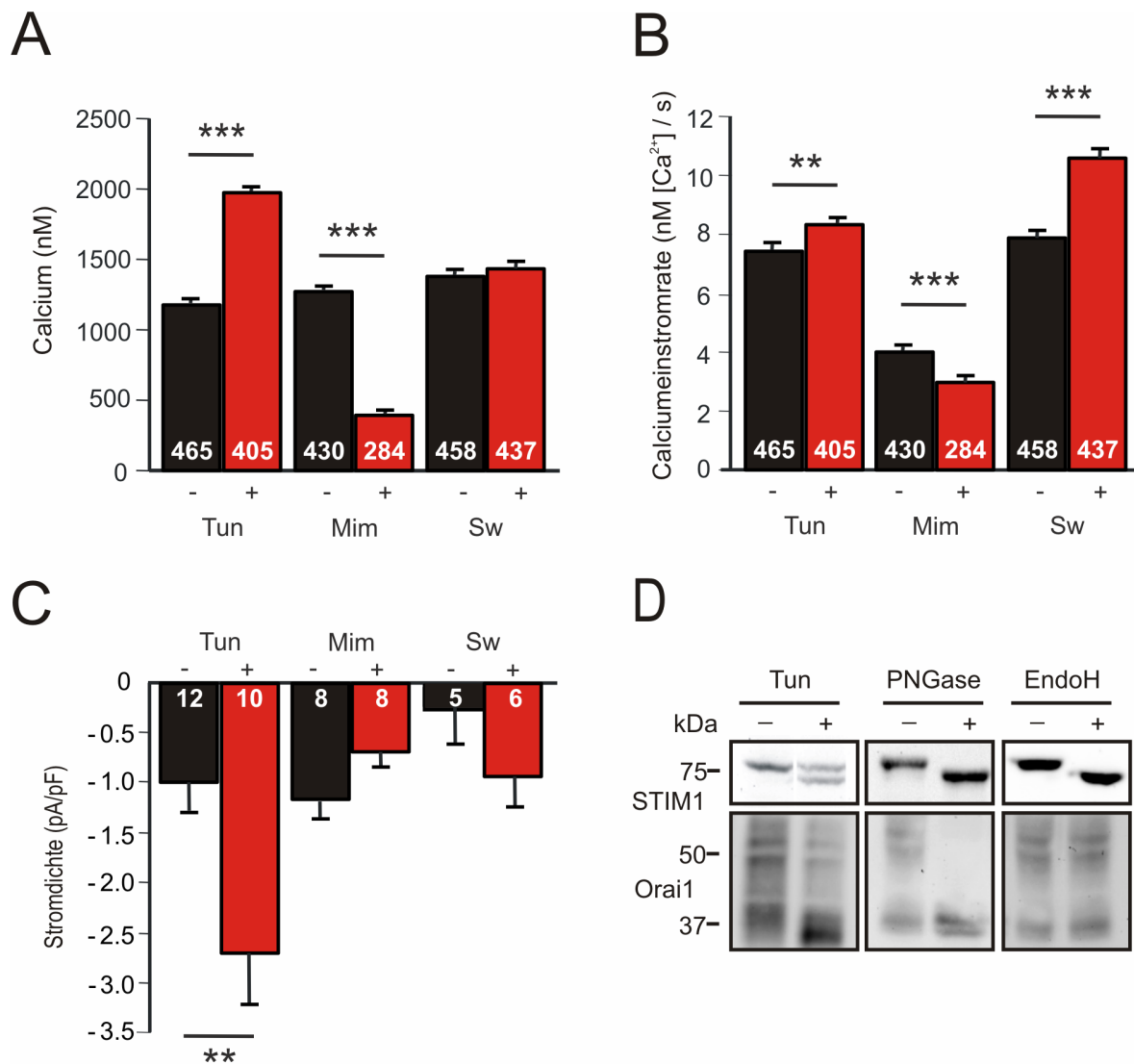


Abbildung 13: Tunicamycinbehandlung blockiert den Prozess der N- Glykosylierung und erhöht SOCE und I_{CRAC} in Jurkat T Zellen. A+B Die Jurkat T Zellen wurden über Nacht mit 3 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin (Tun), 250 μM Mimosin (Mim), 0,5 μM Swainsonin (Sw) oder den entsprechenden Lösemitteln (DMSO, Natriumhydroxid, Methanol) behandelt und in Fura 2AM basierenden Calciumionenkonzentrationsmessungen mit dem Ca^{2+} - Readdition Protokoll untersucht. Die Zellen befanden sich zu Beginn der Messung für 100 s in einer 0,5 mM Ca^{2+} -Lösung. Anschließend wurden die Zellen mit einer Ca^{2+} -freien Lösung perfundiert und weitere 300 s gemessen. Die Speicher wurden durch Zugabe von 1 μM Thapsigargin in Ca^{2+} -freier Lösung entleert (1000 s) und dann wurde der Calciumeinstrom über Kanäle in der Plasmamembran nach Perfusion mit 0,5 mM Ca^{2+} -haltiger Lösung bestimmt (600 s). Statistisch ausgewertet und dargestellt, sind der maximale Calciumeinstrom (A) und die Calciumeinstromrate (B). C Die Zellen wurden wie unter A+B beschrieben behandelt und in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Kontinuierliche Spannungsrampen von -100 mV bis +100 mV wurden angelegt, aufgetragen ist die Stromdichte bei -80 mV nach 110 s. I_{CRAC} wurde durch 50 μM IP_3 in der Pipette ausgelöst und die externe Lösung enthielt 10 mM Ca^{2+} . D Western Blot Analyse von unbehandelten Proteinlysaten aus Jurkat T Zellen die über Nacht mit 3 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin inkubiert wurden bzw. von unbehandelten Zellen, deren Proteinlysate mit PNGase oder EndoH inkubiert wurde. Der Proteinblot wurde mit Antikörpern gegen STIM1 und Orai1 untersucht.

In den Fura 2AM basierenden Calciumimaging Experimenten zeigen die Tunicamycin behandelten Zellen einen erhöhten Calciumeinstrom und eine erhöhte Calciumeinstromrate (siehe Abbildung 13A+B). Die maximale Calciumionenkonzentration steigt nach der Tunicamycinbehandlung von 1175 nM Ca^{2+} auf 1966 nM Ca^{2+} . Die Calciumeinstromrate ist mit 8,32 nM Ca^{2+}/s in den behandelten Zellen signifikant erhöht gegenüber den unbehandelten Zellen mit nur 7,43 nM Ca^{2+}/s . Auch in

den Patch-clamp Experimenten führt Tunicamycin zu einer Erhöhung der Stromdichte (siehe Abbildung 13C) von -0,9 pA/pF auf -2,6 pA/pF. In den Western Blot Analysen bewirkt Tunicamycin eine Verschiebung der STIM1 Bande bei etwa 75 kDa, eine Reduktion der glykosylierten Proteinfraction (Bande bei etwa 50 kDa) und eine Verstärkung der nicht glykosylierten Proteinfraction von Orai1 (Bande bei etwa 37 kDa).

Da Tunicamycin neben der Inhibition der N- Glykosylierung auch einen G1- Zellzyklusarrest zur Folge haben kann (Hsu et al, 2009), wurden Jurkat T- Zellen mit Mimosin behandelt und untersucht. Mimosin wurde ursprünglich aus *Mimosa pudica* isoliert und arretiert Zellen in der G1 Phase durch Blockade der Initiation der DNA- Replikation (Chen et al, 2007). Die Inkubation der Jurkat T Zellen mit Mimosin erniedrigt den maximalen Calciumeinstrom und die Calciumeinstromrate in den Fura 2AM basierenden Calciumkonzentrationsmessungen (siehe Abbildung 13A+B). Die maximale Calciumionenkonzentration wird durch die Behandlung mit Mimosin von 1271 nM Ca^{2+} auf nur noch 401 nM Ca^{2+} drastisch reduziert. Die Calciumeinstromrate reduziert sich nach Mimosininkubation von 3,51 auf 2,95 nM Ca^{2+} /s. Und auch die Stromdichte in den Patch-clamp Experimenten ist, wenn auch nicht signifikant, erniedrigt (siehe Abbildung 13C). Die Stromdichte wird von -1,2 pA/pF auf -0,7 pA/pF reduziert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Tunicamycin in der angewendeten Konzentration nicht zu einer Arretierung des Zellzyklus in Jurkat T Zellen führt.

Die Untersuchung der Proteinlysate im Western Blot zeigte, dass Orai1 PNGase sensitiv, EndoH resistent und damit komplex glykosyliert ist. Wohingegen STIM1 EndoH sensitiv bleibt, was für ein ER residentes Protein zu erwarten ist. Um nun herauszufinden, ob der Effekt von Tunicamycin durch STIM1 oder Orai1 vermittelt ist, wurden Untersuchungen nach Inkubation mit Swainsonin durchgeführt. Diese Substanz hemmt ein Enzym im Golgi- Lumen, also einen späten Schritt der N- Glykosylierung (siehe Abbildung 12), und sollte damit lediglich einen Einfluss auf Orai1 haben.

Der maximale Calciumeinstrom und die Stromdichte sind nach Behandlung der Zellen mit Swainsonin nicht signifikant verschieden, aber die Calciumeinstromrate ist erhöht (siehe Abbildung 13A+B). Die maximale Calciumionenkonzentration in den Kontrollzellen beträgt 1378 nM Ca^{2+} und in den behandelten Zellen 1441 nM Ca^{2+} . Die Stromdichte ist mit -1,12 pA/pF in den behandelten Zellen leicht erhöht gegenüber den unbehandelten Zellen mit -0,27 pA/pF. Auch die Einstromrate mit 10,64 nM Ca^{2+} /s für die Swainsonin behandelten Zellen ist höher als die Einstromrate der unbehandelten Zellen mit nur 7,89 nM Ca^{2+} /s. Diese Ergebnisse deuten auf eine wesentlich Beteiligung von STIM1 und nicht von Orai1 in den Tunicamycin Experimenten hin. Um dieser Hypothese weiter auf den Grund zu gehen wurden glykosylierungsdefiziente Mutanten von den Proteinen STIM1 und Orai1 in Expressionsvektoren kloniert und analysiert.

6.2 Die STIM1 N131D N171Q glykosylierungsdefiziente Mutante verändert den Orai1 vermittelten Calciumstrom

Das STIM1 Protein hat zwei luminale Konsensussequenzen an den Positionen N131 und N171 (siehe Abbildung 14A), die auch beide glykosyliert werden (Williams et al, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Stellen separat oder zusammen in verschiedene Aminosäuren mutiert und die Auswirkungen der Aminosäuresubstitutionen bzw. der fehlenden Glykosylierung in Patch-clamp und Calciumimaging Messungen untersucht. Hierzu wurden die in Expressionsvektoren klonierten Konstrukte via Elektroporation in die Zellen eingebracht und im so genannten Überexpressionssystem untersucht. Bei der Untersuchung des CRAC Stroms im Überexpressionssystem

ist es von Bedeutung, dass immer die beiden essentiellen Komponenten STIM und Orai zusammen überexprimiert werden (Peinelt et al, 2006), nur so kann die Stromdichte amplifiziert werden.

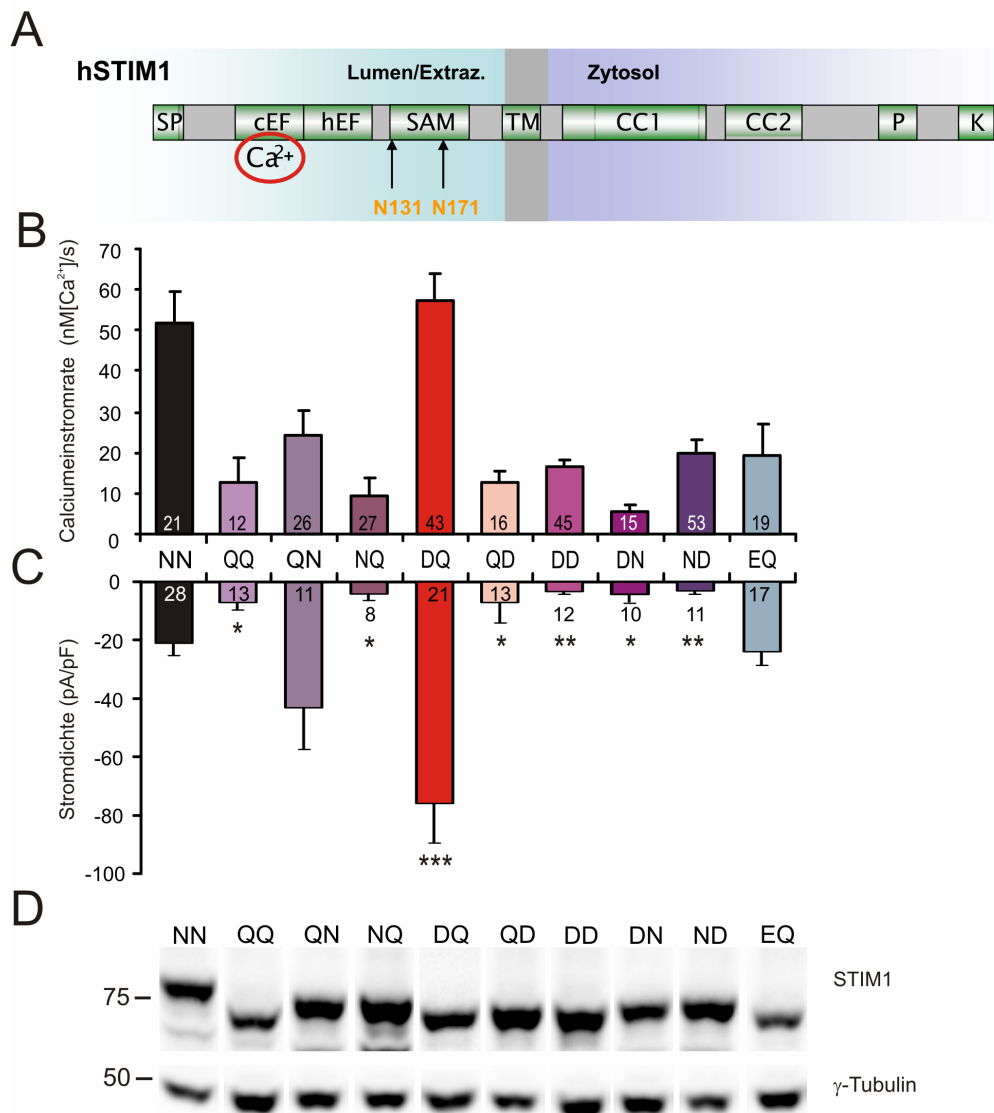


Abbildung 14: Einzelne Aminosäureaustausche in STIM1 N131 und N171 verändern die Orai1 vermittelten Calciumsignale. **A.** Schematische Darstellung des STIM1 Proteins mit den beiden Glykosylierungsseiten an den Positionen N131 und N171 und folgenden Domänen: SP Signalpeptid; cEF und hEF Ca^{2+} -Bindedomänen; SAM Protein Interaktionsdomäne; TM Transmembrandomäne; CC1 und CC2 Coiled-coil Orai1 Bindedomänen; P Prolin- reiche Region; K poly Lysin- reiche Region. **B** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μg Orai1 und 1,5 μg der jeweiligen STIM1 Mutante transfiziert und anschließend in Fura 2AM basierenden Calciumionenkonzentrationsmessungen mit dem Ca^{2+} - Readdition Protokoll untersucht. Die Zellen befanden sich zu Beginn der Messung für 100 s in einer 0,5 mM Ca^{2+} -Lösung. Anschließend wurden die Zellen mit einer Ca^{2+} -freien Lösung perfundiert und weitere 300 s gemessen. Die Speicher wurden durch Zugabe von 1 μM Thapsigargin in Ca^{2+} -freier Lösung entleert (1000 s) und dann wurde der Calciumeinstrom über Kanäle in der Plasmamembran nach Perfusion mit 0,5 mM Ca^{2+} -haltiger Lösung bestimmt (600 s). Statistisch ausgewertet und dargestellt ist die Calciumeinstromrate. **C** HEK293 Zellen wurden wie unter B beschrieben transfiziert und in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Die externe Badlösung enthielt 2 mM Ca^{2+} , und kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt. Der Strom wurde durch 50 μM IP_3 in der Pipette aktiviert. Dargestellt ist die Stromdichte bei -130 mV nach 110 s. **D** HEK293 Zellen wurden wie unter B beschrieben transfiziert und die Proteinlysate im Western Blot untersucht. Der Proteinblot wurde mit Antikörpern gegen STIM1 und zur Ladekontrolle gegen γ -Tubulin untersucht.

Die klassische Doppelmutante (STIM1N131Q N171Q, kurz: QQ) zeigt signifikant reduzierte Calciumsignale (siehe Abbildung 14B), was bereits von Csutora P et al. (Csutora et al, 2008) gezeigt

werden konnte. Die Calciumeinstromrate reduziert sich von 52,02 nM Ca^{2+} /s beim WT auf 12,77 nM Ca^{2+} /s bei der QQ Mutante. Die Stromdichte im Patch wird durch die Mutation zur glykosylierungsdefizienten QQ Mutante von -21,12 pA/pF auf -7,12 pA/pF reduziert. Um zu untersuchen, ob die erste oder die zweite Glykosylierungsseite für diesen Effekt wichtig ist, wurden die beiden Einzelmutanten (N171Q, kurz: NQ und N131Q, kurz: QN) untersucht. Während die alleinige Mutation der ersten Glykosylierungsseite die Stromdichte nicht signifikant verändert, verkleinert die alleinige Mutation N171Q an der zweiten Stelle diese. Die STIM1QN Mutante induziert eine Influxrate von 24,11 nM Ca^{2+} /s und eine Stromdichte von -43,02 pA/pF. Die Transfektion der STIM1NQ Mutante induziert eine Calciumeinstromrate von 9,62 nM Ca^{2+} /s und eine Stromdichte von -3,94 pA/pF. Da die Ergebnisse nicht im Einklang mit den Tunicamycin Daten (Vergrößerung der Stromdichte) stehen, und es einen Hinweis aus der Literatur gibt, dass die Mutation eines Asparagins in ein Glutamin in der NXS/T- Konsensussequenz nicht die Sekundärstruktur des Asx-turns unterstützt, welcher wichtig für die Erkennung durch die Oligosaccharyl- Transferasen (OT) ist (Imperiali & Hendrickson, 1995) und damit eventuell für die Proteinfaltung im ER von Bedeutung ist, wurde N131 zu einer Asparaginsäure (D) mutiert. Die Asparaginsäure ist zwar kein Substrat für die OTs, aber verändert die Sekundärstruktur nicht in demselben Maße, wie es das Glutamin an dieser Position tut. Die STIM1N131DN171Q Mutante (kurz: DQ) induziert stark vergrößerte Stromdichten, im Mittel -75,91 pA/pF, in den whole cell Patch-clamp Messungen. Zunächst sind jedoch keine unterschiedlichen Calciumeinstromraten in den Calciumkonzentrationsmessungen sichtbar. Diese Unterschiede konnten allerdings später durch Erniedrigung der externen Calciumionenkonzentration aufgedeckt werden (siehe unten). Interessanterweise zeigt keine der zusätzlich generierten Mutanten bei denen Asparaginsäure anstelle des Asparagins mutiert wurde (kurz: QD, DD; DN; ND), ähnliche Effekte. Die DQ Mutante verändert also die Struktur/Funktion des Proteins auf eine spezifische Weise. Andere Mutanten zeigen eher eine starke Reduktion der Calciumsignale. Die Influxraten liegen bei 12,55 nM Ca^{2+} /s für QD, 16,40 nM Ca^{2+} /s für DD, 5,29 nM Ca^{2+} /s für DN und 20,08 nM Ca^{2+} /s für ND. Die induzierten Stromdichten in den whole cell Patch-clamp Experimenten korrelieren sehr gut mit den Daten aus den Calciumkonzentrationsmessungen und liegen bei -7,12 pA/pF für QD, -3,17 pA/pF für DD, -4,30 pA/pF für DN und bei -3,14 pA/pF für ND. Um zu untersuchen, ob der faszilatorische Effekt der DQ Mutante auf das Einfügen einer negativen Ladung an Position 131 zurückzuführen ist, wurde Asparagin 131 gegen Glutaminsäure ausgetauscht. Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, zeigt die STIM1N131EN171Q-Mutante (kurz: EQ) zwar keine Erniedrigung der Stromdichten, kann aber den verstärkenden Effekt der DQ-Mutante nicht imitieren. Die Einstromrate nach Transfektion der STIM1EQ Mutante liegt bei 19,15 nM Ca^{2+} /s und die Stromdichte bei -23,88 pA/pF. Um zu überprüfen, ob die verschiedenen Mutanten eine normale Proteinexpression und die zu erwartenden Veränderungen des der molekularen Masse zeigen wurden Proteinlysate im Western Blot untersucht. Abbildung 14D zeigt, dass alle STIM1 glykosylierungsdefizienten Mutanten ähnlich stark exprimiert werden. Bei Mutation beider Glykosylierungsstellen zeigt sich eine stärkere Reduktion im Molekulargewicht. Zusätzlich ist ersichtlich, dass sowohl N131 als auch N171 noch an einer Stelle glykosyliert werden (intermediäres MW).

6.3 Die STIM1N131DN171Q- Supermutante

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die STIM1DQ Mutante als Einzige eine Gain-of-Function Mutation darstellt, sollte diese zunächst in Patch-clamp Analysen und in Calciumimagingexperimenten genauer charakterisiert werden.

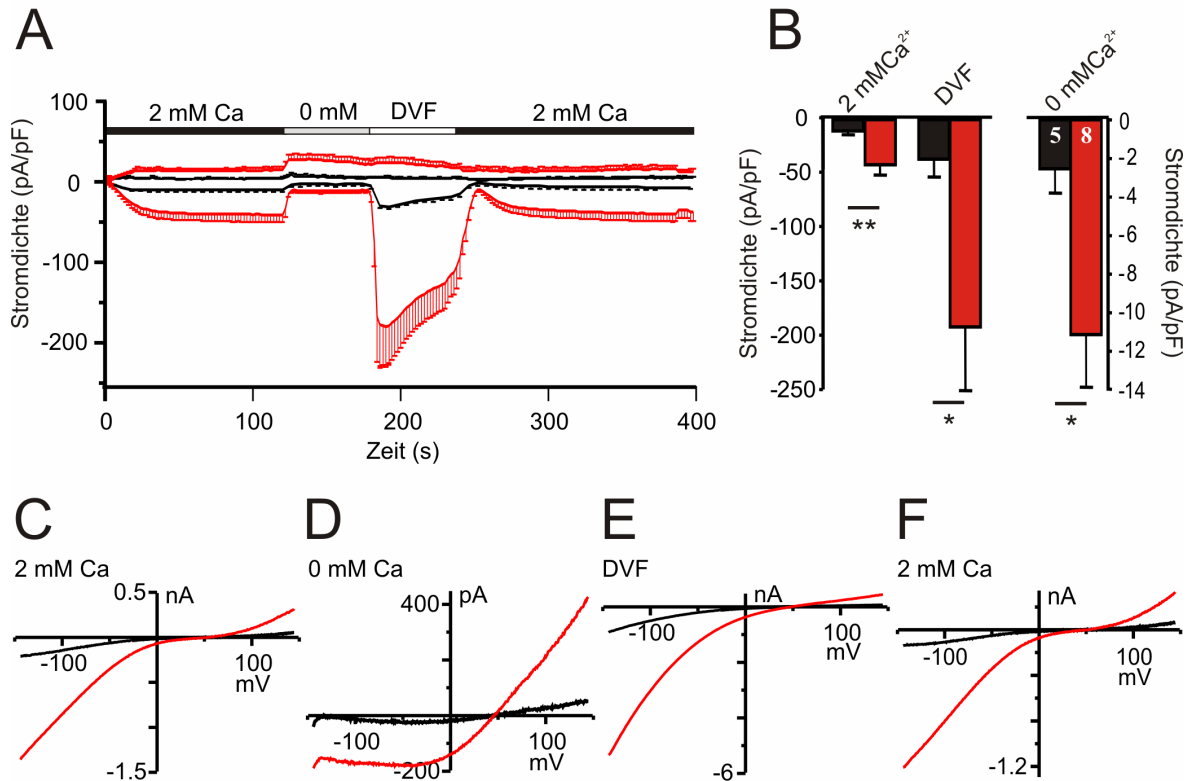


Abbildung 15: Die STIM1DQ Mutante stellt eine Gain-of-Function Mutation dar und verstärkt die Orai1 vermittelten Ionenströme um ein Vielfaches. HEK293 Zellen wurden mit 0,5 µg Orai1 und 1,5 µg STIM1WT (schwarz) bzw. STIM1DQ (rot) transfiziert und anschließend in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Die Zellen wurden mit den angegebenen Lösungen perfundiert und kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt. Der Strom wurde durch 50 µM IP₃ in der Pipette aktiviert und die externe Lösung enthielt 2 mM Ca²⁺. **A** Dargestellt ist die Stromdichte bei -80 mV und +130 mV, normiert auf die Zellgröße, über die Zeit. **B** Statistische Auswertung der maximalen Ströme in 2 mM Ca²⁺-, 0 mM Ca²⁺- und DVF- Lösung **C-F** Strom- Spannungskennlinien der CRAC Ströme in 2 mM Ca²⁺-, 0 mM Ca²⁺- und DVF- Lösung, extrahiert aus der Messung in A nach jedem Lösungswechsel.

Die STIM1DQ Mutante verstärkt den Orai1 vermittelten I_{CRAC} um ein Vierfaches, von -10,13 pA/pF für den STIM1WT auf -41,11 pA/pF für den STIM1DQ vermittelten Strom. Nach Perfusion der Zellen mit einer 0 mM Ca²⁺ Lösung sollte der Calcium-spezifische CRAC Strom nahe null sein. In der 0 mM Ca²⁺ Lösung ist die Stromdichte in den STIM1WT transfizierten Zellen -2,5 pA/pF, in den STIM1DQ transfizierten Zellen aber immernoch -11,13 pA/pF. In der Abwesenheit zweiwertiger Ionen leiten die STIM1DQ transfizierten Zellen einen Natriumstrom in der Größenordnung mehrerer Nanoampere. Unter diesen Bedingungen induziert das STIM1WT Protein eine Stromdichte von -35,79 pA/pF und das STIM1DQ Protein von -190,65 pA/pF. Die Strom-Spannungskennlinien (IV) der von STIM1DQ und STIM1WT induzierten Ströme sind zwar amplifiziert im Fall der Mutante, aber von der Form ähnlich. Die IVs in der 2 mM Ca²⁺ Lösung sind einwärts-rektifizierend und weisen ein Umkehrpotential im positiven Bereich auf (siehe Abbildung 15C+F). Auch die Strom- Spannungskennlinien des STIM1DQ induzierten Stroms in 0 mM Ca²⁺-

Lösung oder unter Divalent- freien Bedingungen (siehe Abbildung 15D+E) sind lediglich vergrößert im Vergleich zu denen des STIM1WT induzierten Stroms.

In den Fura 2AM basierenden Calciumimagingexperimenten mit einer 0,1 mM Ca^{2+} - Lösung können vier Unterschiede zwischen den Calciumsignalen von Zellen transfiziert mit STIM1DQ bzw. STIM1WT aufgedeckt werden (siehe Abbildung 16A).

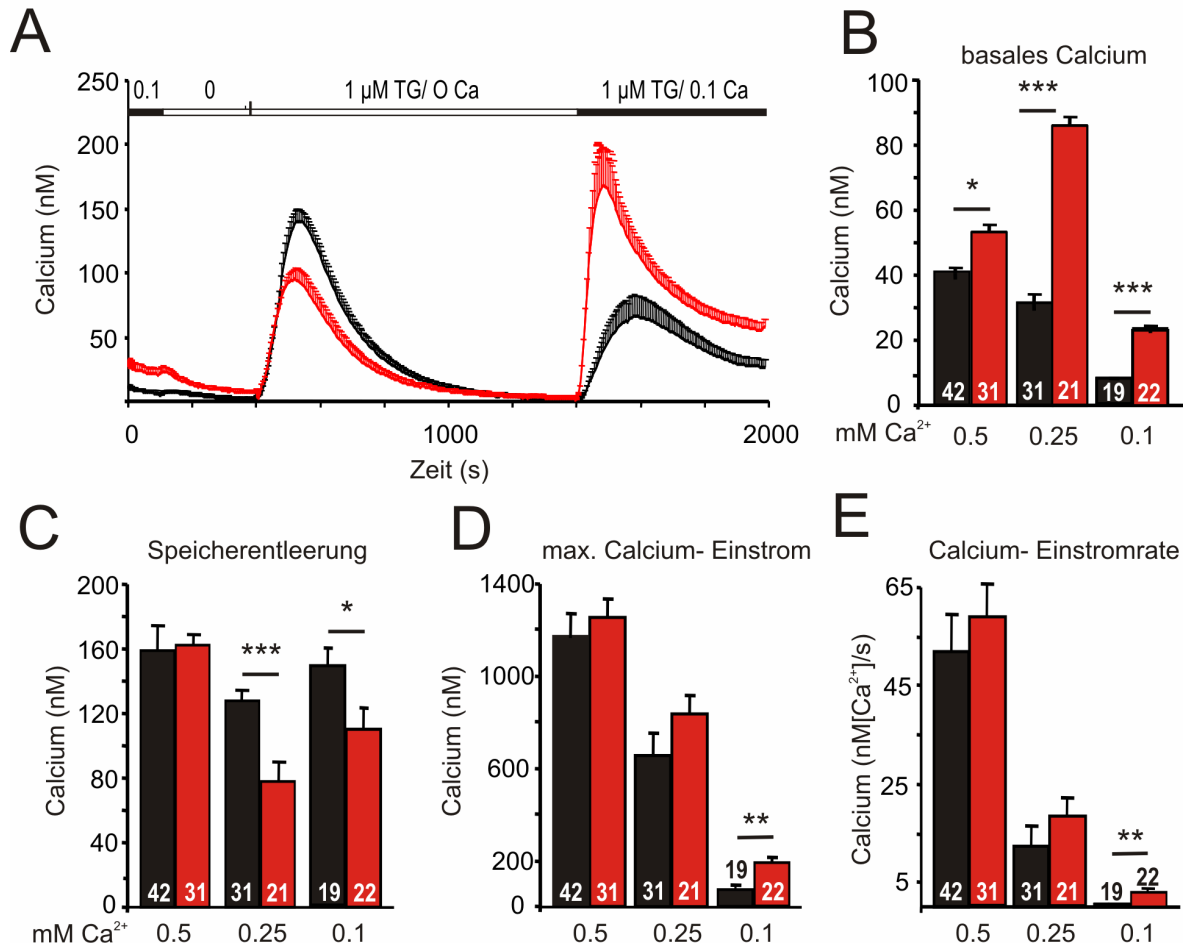


Abbildung 16: Der STIM1DQ Phänotyp lässt sich in Calciumimagingexperimenten erst durch Erniedrigung der externen Calciumionenkonzentration aufdecken. A HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μg Orail und 1,5 μg STIM1WT (schwarz) bzw. STIM1DQ (rot) transfiziert und anschließend in Fura 2AM basierenden Calciumionenkonzentrationsmessungen mit dem Ca^{2+} - Readdition Protokoll untersucht. Die Zellen befanden sich zu Beginn der Messung für 100 s in einer 0,1 mM Ca^{2+} -Lösung. Anschließend wurden die Zellen mit einer Ca^{2+} -freien Lösung perfundiert und weitere 300 s gemessen. Die Speicher wurden durch Zugabe von 1 μM Thapsigargin in Ca^{2+} -freier Lösung entleert (1000 s) und dann wurde der Calciumeinstrom über Kanäle in der Plasmamembran nach Perfusion mit 0,1 mM Ca^{2+} -haltiger Lösung bestimmt (600 s). Zeitlicher Verlauf der Änderungen der internen Calciumionenkonzentration nach Perfusion mit verschiedenen Lösungen. B-E HEK293 Zellen wurden wie unter A beschrieben transfiziert und untersucht. Statistisch ausgewertet und dargestellt sind das basale Ca^{2+} (B), die Höhe der Speicherentleerung (C), der maximale Calciumeinstrom (D) und die Calciumeinstromrate (E) nach Messungen in externen Lösungen mit unterschiedlicher Calciumionenkonzentration.

Das basale Ca^{2+} der mit STIM1DQ transfizierten Zellen liegt mit 22,5 nM signifikant über dem Wert der STIM1WT transfizierten Zellen mit 8,7 nM. Der Calciumausstrom aus dem ER ist mit einem durchschnittlichen Maximalwert von 108 nM geringer als der des STIM1WT mit durchschnittlich 148 nM. Die Calciumeinstromrate und der maximale Calciumeinstrom hingegen sind in den mit STIM1DQ transfizierten Zellen allerdings wieder deutlich erhöht (3 nM Ca^{2+} /s versus 0,3 nM Ca^{2+} /s und 186 nM versus 73 nM). Die Abbildung 16B-E zeigen die Gegenüberstellungen

des basalen Ca^{2+} , der Höhe der Speicherentleerung, des maximalen Calciumeinstroms und der Calciumeinstromrate von STIM1WT und STIM1DQ transfizierten Zellen in verschiedenen Badlösungen mit unterschiedlicher Calciumionenkonzentration. Der Unterschied im basalen Ca^{2+} ist bei unterschiedlichen externen Calciumionenkonzentration signifikant (siehe Abbildung 16B). Wohingegen die Unterschiede in der Speicherentleerung, sowie im Calciumeinstrom (siehe Abbildung 16C-E) erst bei niedrigeren externen Calciumionenkonzentrationen (0,25 mM und 0,1 mM Ca) signifikant sind.

Auf der Suche nach dem Grund für diese enorme Vergrößerung der Stromdichte und der Calciumeinstromrate wurden Untersuchungen mittels nicht-stationärer Noise-Analyse und Offenwahrscheinlichkeitsanalysen durchgeführt. Es sollte bestimmt werden, ob die Einzelkanalleitfähigkeit oder eventuell die Offenwahrscheinlichkeit der einzelnen Orai1 Kanäle verändert ist, oder ob die Anzahl aktiver Kanäle in der Membran differiert.

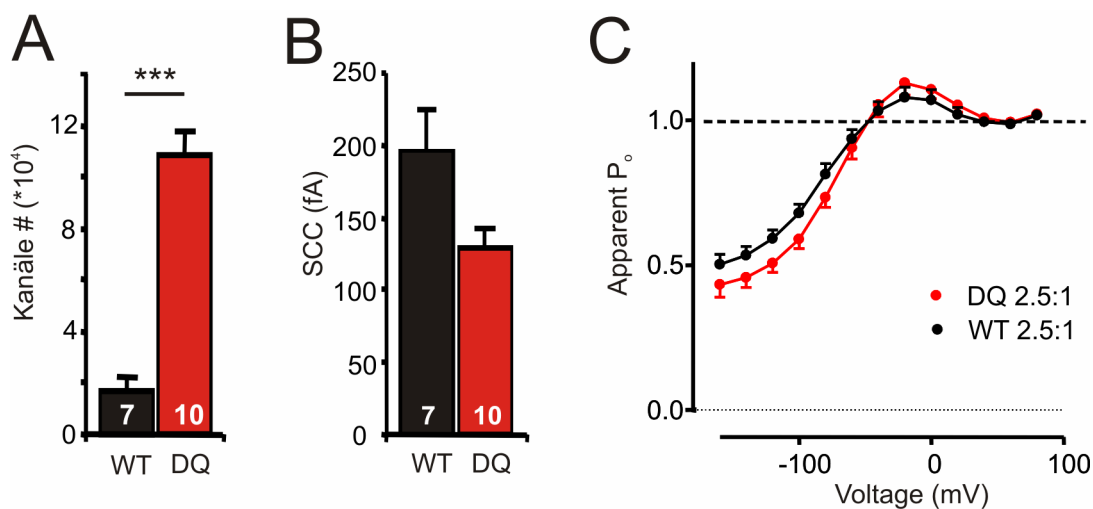


Abbildung 17: STIM1DQ aktiviert mehr Orai1 Kanäle in der Plasmamembran. A-B HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μg Orai1 und 1,5 μg STIM1WT (schwarz) bzw. STIM1DQ (rot) transfiziert und mit nicht-stationärer Noise Analyse in Patch-clamp Experimenten untersucht. Dargestellt sind die Anzahl aktiver Orai1 Kanäle (A) und die Einzelkanalleitfähigkeit (SCC = single channel conductance) (B) im Vergleich. Die Methode ist beschrieben unter 5.9.3 C HEK293 Zellen wurden mit 1,5 μg Orai1 und 0,5 μg STIM1WT (schwarz) bzw. STIM1DQ (rot) transfiziert und in Patch-clamp Experimenten untersucht. Dargestellt ist die Offenwahrscheinlichkeit der Orai1 Kanäle in Abhängigkeit von der angelegten Spannung. Die Methode ist beschrieben unter 5.9.2

Die nicht-stationäre Noise-Analyse zeigt in Abbildung 17A+B, dass die Anzahl aktiver Orai1 Kanäle in der Membran bei Kotransfektion mit dem STIM1DQ Konstrukt 6,5 mal größer ist, als bei Kotransfektion mit dem STIM1WT Konstrukt. Es sind 108417 Kanäle im Fall von STIM1DQ und lediglich 16666 Kanäle bei STIM1WT aktiv. Die Einzelkanalleitfähigkeit und die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle sind allerdings unter beiden Bedingungen ähnlich und zeigen keine signifikanten Differenzen (siehe Abbildung 17C). Die erhöhte Stromdichte in STIM1DQ transfizierten Zellen wird also durch eine größere Anzahl aktiver Orai1 Kanäle bestimmt.

6.4 STIM1DQ reduziert die Orai1 Proteinkonzentration

Neben der biophysikalischen Charakterisierung des STIM1DQ induzierten CRAC Stroms, wurden auch proteinbiochemische Analysen durchgeführt. Untersucht wurden Ganzzell-Proteinlysate in

Western Blot Analysen und zudem wurden Biotinylierungsexperimente zur Bestimmung der Proteinfraktionen in der Plasmamembran durchgeführt.

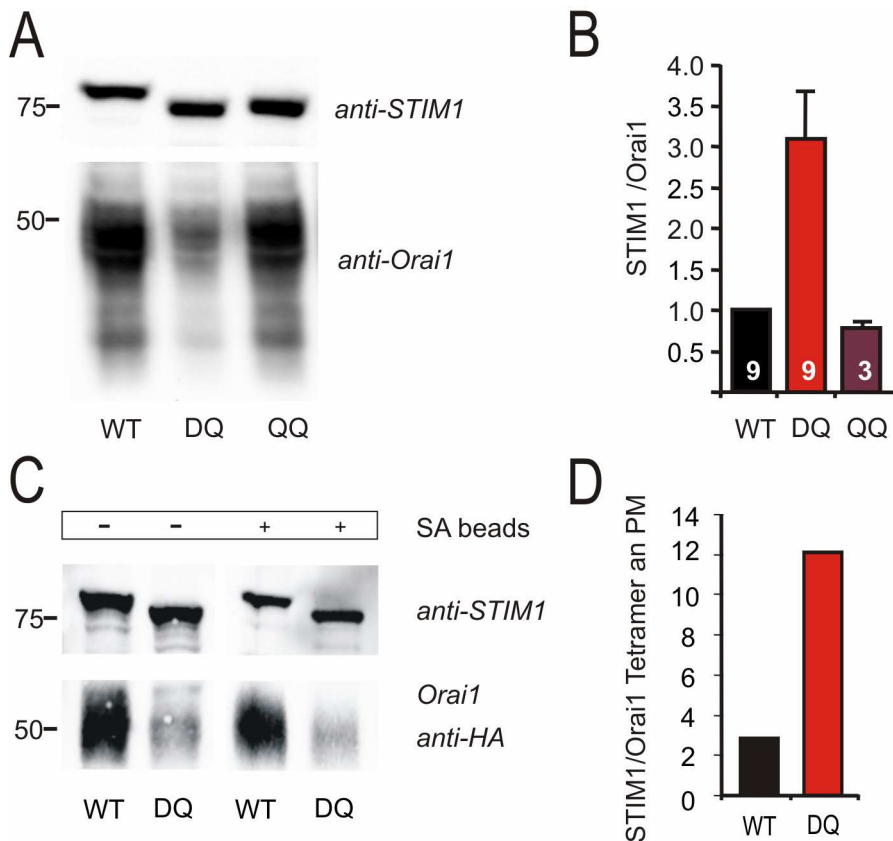


Abbildung 18: STIM1DQ optimiert das STIM1:Orai1 Proteinratio. A-B HEK293 Zellen wurden mit 0,5 µg Orai1 und 1,5 µg STIM1WT (schwarz), STIM1DQ (rot) bzw. STIM1QQ (magenta) transfiziert und 48 h nach Transfektion auf Proteinebene untersucht. Dargestellt ist der Originalblot inkubiert mit Antikörpern gegen STIM1 und Orai1 (A) und die entsprechende quantitative Analyse, in der das STIM1:Orai1 Proteinverhältnis berechnet ist. Hier wurden die Proteinverhältnisse auf das STIM1WT:Orai1 Verhältnis normiert (B). C-D HEK293 Zellen wurden mit 0,5 µg Orai1 und 1,5 µg STIM1WT (schwarz) bzw. STIM1DQ (rot) transfiziert und 48 h nach Transfektion in einem Biotinylierungsexperiment untersucht. Dargestellt ist der Originalblot inkubiert mit Antikörpern gegen STIM1 und Orai1 (C), wobei die ersten beiden Reihen die Inputkontrolle vor Inkubation mit den Beads und damit das Gesamtprotein darstellen und die beiden anderen Reihen die Proteinfraktion in der Plasmamembran widerspiegeln, und die entsprechende quantitative Analyse, in der das STIM1:Orai1 Proteinverhältnis berechnet wurde. Hier wird die STIM1 Proteinmenge im Gesamtlysat zu der Orai1 Proteinmenge in der Plasmamembran ins Verhältnis gesetzt (D).

In insgesamt neun verschiedenen Experimenten zeigt sich, dass die Orai1 Proteinmenge nach Kots transfektion mit STIM1DQ reduziert ist, verglichen mit der Kots transfektion mit STIM1WT oder STIM1QQ (siehe Abbildung 18B). Die Quantifizierung der Experimente weist ein dreimal höheres STIM1:Orai1 Verhältnis für die DQ Mutante auf. Die Proteinratios für STIM1WT und STIM1QQ sind annähernd gleich. Auch in dem Biotinylierungsexperiment in Abbildung 18C+D ist die Reduktion der Orai1 Bande im Fall der Kots transfektion mit STIM1DQ deutlich sichtbar. Zudem ist zu beobachten, dass nach Kots transfektion mit STIM1DQ weniger Orai1 Protein bezogen auf das Gesamtlysat in der PM ist. Mit dem Biotinylierungsexperiment konnte die STIM1 Menge im Gesamtlysat auf die Orai1 Menge in der Plasmamembran quantifiziert werden. Dies ist insofern sinnvoll, da lediglich die Orai1 Moleküle in der Plasmamembran aktive Kanäle bilden, Orai1 Protein aus dem ER oder dem Golgi würden das Verhältnis also verfälschen. Das Verhältnis wird zudem als STIM1 pro Orai1 Tetramer angegeben, weil bekannt ist, dass immer vier einzelne Orai1 Moleküle

zu einem aktiven Kanal zusammengeschlossen werden (Penna et al, 2008). So ergibt sich, dass insgesamt mehr STIM1DQ Moleküle für die Aktivierung eines Orai1 Tetramers in der Plasmamembran zur Verfügung stehen. Dies bedeutet zwar, dass die Gesamtmenge an Orai1 Kanälen durch die Kotransfektion mit STIM1DQ reduziert wird, aber deswegen auch mehr STIM1DQ Moleküle für die optimale Aktivierung der Tetramere zur Verfügung stehen.

Um die Theorie zu verfolgen, dass dieses optimierte Verhältnis von STIM1 zu Orai1 im Fall von STIM1DQ auch der Grund für die veränderten Calciumsignale ist, wurden alle STIM1 Mutanten mit Orai1 koexprimiert und auf Proteinebene untersucht.

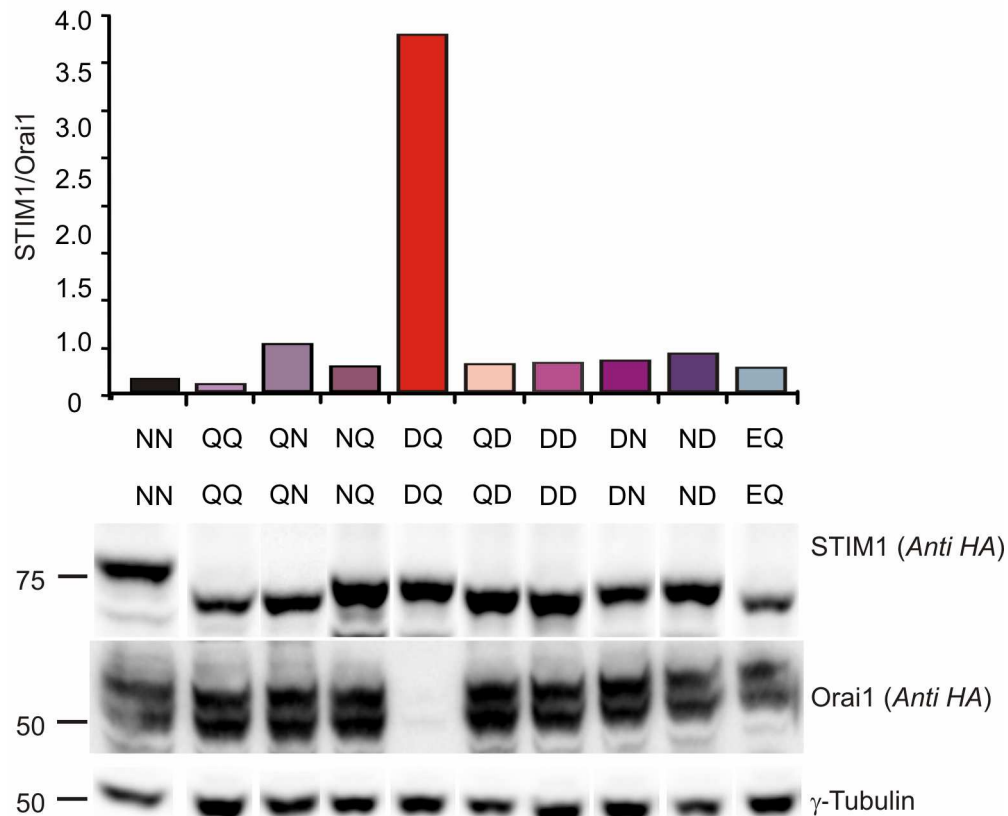


Abbildung 19: Nur die STIM1DQ Mutante verändert drastisch das STIM1:Orai1 Proteinverhältnis. HEK293 Zellen wurden mit 0,5 µg Orai1 und 1,5 µg des entsprechenden STIM1 Konstrukts transfiziert und 48 h nach Transfektion auf Proteinebene untersucht. Dargestellt ist der Originalblot inkubiert mit Antikörpern gegen den HA- Tag, der in allen Konstrukten vorkommt und die entsprechende quantitative Analyse, in der das STIM1:Orai1 Proteinverhältnis berechnet ist. Der Blot wurde mit einem γ-Tubulin Antikörper zur Ladekontrolle redetektiert.

Der Proteinblot aller STIM1 Mutanten und die quantitative Analyse in Abbildung 19 bestätigen die Annahme, dass das STIM1:Orai1 Proteinverhältnis lediglich in den STIM1DQ transfizierten Zellen verändert ist, wobei alle STIM1 Konstrukte annähernd gleich stark exprimiert werden.

6.5 Der STIM1DQ Effekt tritt bereits sechs Stunden nach Transfektion auf

Um abschätzen zu können, welche molekularen Grundlagen dem durch die Kotransfektion mit STIM1DQ hervorgerufenen Proteinshift in der Orai1 Proteinkonzentration zu Grunde liegen könnten, z.B. Inhibition der Translation oder verstärkte Proteindegradation, sollte der zeitliche Verlauf des Effekts ermittelt werden. Hierzu wurden transfizierte Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion geerntet und die Proteinlysate mittels eines Western Blots analysiert. Zudem

wurden Zellen lediglich sechs Stunden nach der Transfektion gepatcht, um zu testen, ob bereits nach dieser kurzen Zeitspanne ein Unterschied in der Stromdichte zu erkennen ist.

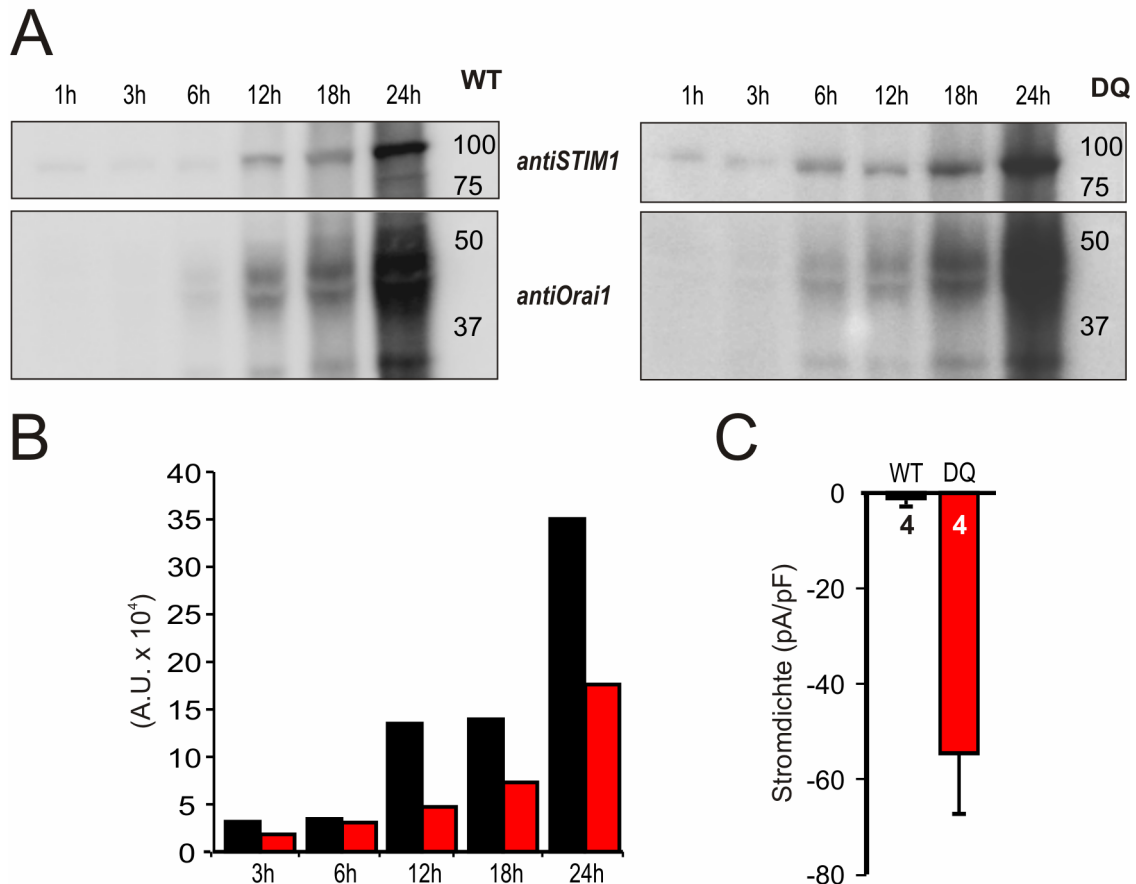


Abbildung 20: Der Shift im STIM1:Orai1 Ratio und die vergrößerte Stromdichte von I_{CRAC} nach Aktivierung mit STIM1DQ treten bereits wenige Stunden nach der Transfektion auf. **A** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μ g Orai1 und 1,5 μ g STIM1WT (schwarz) bzw. STIM1DQ (rot) transfiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Transfektion auf Proteinebene untersucht. Dargestellt ist der Originalblot inkubiert mit Antikörpern gegen STIM1 und Orai1. **B** Quantitative Auswertung der Proteinblots aus A. Dargestellt ist die Orai1 Proteinmenge in den Proteinlysaten drei, sechs, zwölf, 18 und 24 Stunden nach Transfektion. Ausgelassen wurde hier die Auswertung der Proben 1 h nach Transfektion, da diese kaum Signale aufwiesen. **C** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μ g Orai1 und 1,5 μ g STIM1WT (schwarz) bzw. STIM1DQ (rot) transfiziert und sechs Stunden nach der Transfektion in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt. Dargestellt ist die Stromdichte bei -130 mV, normiert auf die Zellgröße.

Die Abbildung 20B zeigt, dass die Orai1 Proteinmenge in den STIM1DQ exprimierenden Zellen bereits drei Stunden nach der Transfektion niedriger ist, als in den Zellen, die STIM1WT exprimieren. Abgesehen von der Probe nach sechs Stunden ist die Orai1 Proteinmenge nach Kotransfektion mit STIM1DQ immer mehr als die Hälfte reduziert im Vergleich zur Kotransfektion mit STIM1WT. Obwohl die Orai1 Proteinmenge sechs Stunden nach der Transfektion in beiden Zellpopulationen annähernd gleich ist, weist die Stromdichte enorme Unterschiede auf. Während STIM1WT lediglich eine mittlere Stromdichte von -1,11 pA/pF vermittelt, liegt die mittlere Stromdichte des STIM1DQ induzierten CRAC-Stroms bei -54,59 pA/pF (siehe Abbildung 20C). Dies weist auf einen zusätzlichen Effekt der STIM1DQ Mutante hin.

6.6 Das STIM1WT Protein kann die Effekte von STIM1DQ nicht imitieren

Für den Fall, dass lediglich das veränderte Proteinverhältnis von STIM1 und Orai1 für die STIM1DQ Effekte verantwortlich ist, sollten diese Effekte durch Veränderung der STIM1WT zu Orai1 Proteinmenge imitiert werden können. Um dies zu untersuchen, wurden HEK293 Zellen mit verschiedenen STIM1WT zu Orai1 DNA Verhältnissen transfiziert und dann elektrophysiologisch und auf Proteinebene untersucht.

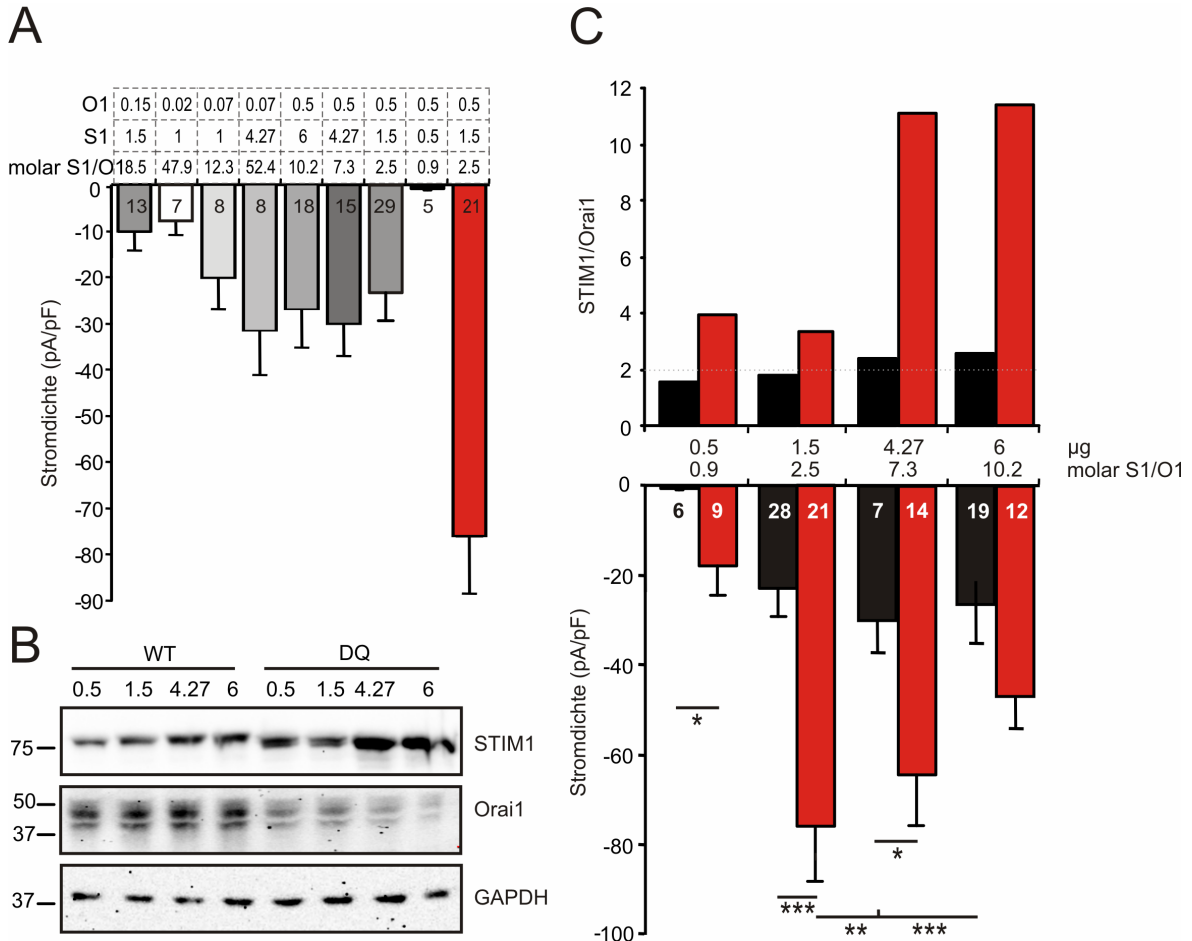


Abbildung 21: Der STIM1WT induzierte Calciumstrom kann durch Erhöhung der STIM1WT Proteinmenge vergrößert werden, erreicht aber niemals das STIM1DQ Niveau. **A** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 µg Orai1 und unterschiedlichen Mengen an STIM1WT (grau-Töne) oder STIM1DQ (rot) transfiziert und in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Die transfizierten Orai1 bzw. STIM1 Mengen in µg und das sich daraus ergebende theoretische, molare STIM1:Orai1 Verhältnis sind im oberen Teil der Figur angegeben. Die externe Ca^{2+} -Lösung enthielt 2 mM Ca^{2+} und kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt. Der Strom wurde durch 50 µM IP_3 in der Pipette ausgelöst. Dargestellt ist die Stromdichte bei -130 mV nach 110s, normiert auf die Zellgröße. **B** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 µg Orai1 und unterschiedlichen Mengen an STIM1WT (schwarz) oder STIM1DQ (rot) transfiziert und auf Proteinebene untersucht. Der Proteinblot wurde mit Antikörpern gegen STIM1, Orai1 und als Ladekontrolle gegen GAPDH inkubiert. **C** Quantifizierung des Proteinblots in B. Dargestellt ist das Verhältnis von STIM1 über Orai1. Unterhalb der Quantifizierung sind nochmals die transfizierten STIM1 DNA Mengen und die entsprechenden molaren STIM1 zu Orai1 Proteinverhältnisse angegeben. Zudem wurden die Zellen aus B in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Die externe Ca^{2+} -Lösung enthielt 2 mM Ca^{2+} und kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt. Der Strom wurde durch 50 µM IP_3 in der Pipette ausgelöst. Dargestellt ist die Stromdichte bei -130 mV nach 110s, normiert auf die Zellgröße.

Die Abbildung 21A zeigt, dass man durch Veränderung des STIM1WT zu Orai1 Verhältnisses die Stromdichte von I_{CRAC} verändern kann, jedoch erreichen die STIM1WT induzierten Ströme nicht

die Größe des STIM1DQ induzierten Stroms. Eine große Stromdichte von über -30 pA/pF entsteht nach Transfektionen mit theoretischen STIM1:Orai1 Ratios von über 50, aber auch von etwa sieben. Eine sehr kleine Stromdichte von etwa -7 pA/pF entsteht bei einem theoretischen Ratio von 48. Dies weist darauf hin, dass man anhand der transfizierten DNA Menge nicht auf die wirkliche Proteinmenge und damit auf die Stromdichte schließen kann. So wurden Zellen mit ausgewählten Transfektionsverhältnissen transfiziert, gepatcht und auf Proteinebene untersucht (siehe Abbildung 21B+C). Der Proteinblot bestätigt erneut die Herrunterregulierung der Orai1 Proteinmenge im Fall der Kotransfektion mit STIM1DQ. Je mehr STIM1DQ Protein gebildet wird, desto weniger Orai1 Protein kann detektiert werden. Die Quantifizierung der Banden zeigt, dass das Proteinratio mit STIM1DQ für alle Transfektionen höher ist. Das STIM1WT zu Orai1 Ratio steigt für die Transfektionen mit mehr STIM1WT leicht an. Die entsprechenden Patch-clamp Experimente zeigen den direkten Vergleich zwischen den STIM1WT und STIM1DQ induzierten Strömen. Die maximale Stromdichte wird bei dem STIM1DQ zu Orai1 Transfektionsverhältnis von 1,5 zu 0,5 erreicht. Hier beträgt die Stromdichte -76,05 pA/pF. Durch Transfektion von mehr STIM1DQ DNA wird dann die Stromdichte reduziert. Der STIM1WT induzierte Strom kann zwar durch die Transfektion von mehr STIM1WT Protein anfänglich vergrößert werden, ist aber ab einem Transfektionsverhältnis von 4,27 zu 0,5 nicht mehr amplifizierbar. Die Stromdichte bei diesem Transfektionsverhältnis beträgt -30,15 pA/pF. Vergleicht man nun die tatsächlichen Proteinratios nach Transfektion von 0,5 µg Orai1 und 1,5 µg STIM1DQ mit dem nach Transfektion von 0,5 µg Orai und 6 µg STIM1WT, so sind die Werte annähernd gleich. Dennoch sind die Stromdichten mit etwa -76 pA/pF für den STIM1DQ induzierten Strom und -25 pA/pF für den STIM1WT induzierten Strom sehr unterschiedlich. Diese Ergebnisse deuten wieder auf einen zusätzlichen Effekt der STIM1DQ Mutante hin.

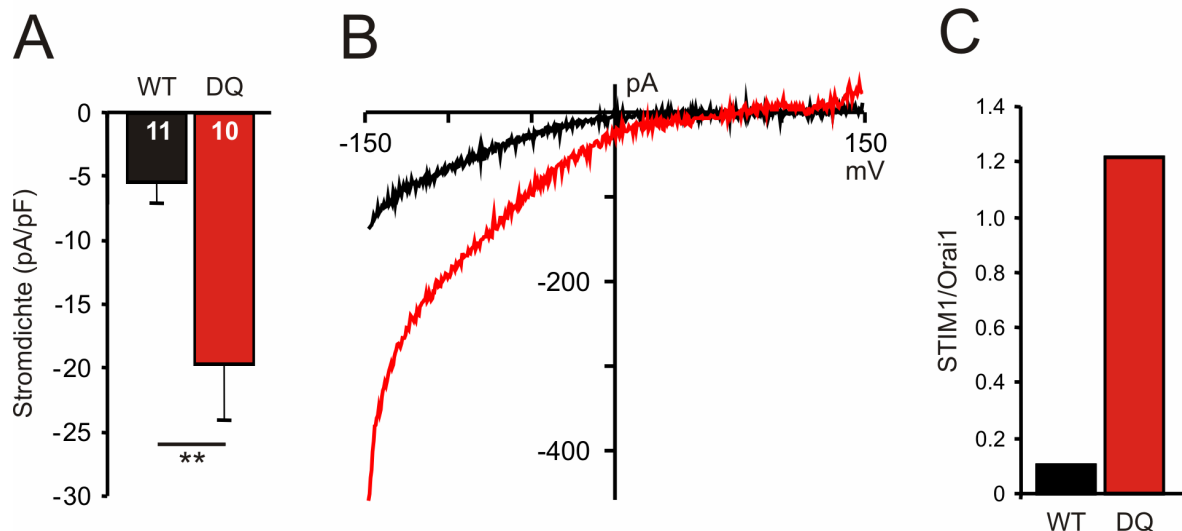


Abbildung 22: Auch ein Transfektionsverhältnis von 3 Orai zu 1 STIM induziert sehr viel größere STIM1DQ vermittelten I_{CRAC} . A HEK293 Zellen wurden mit 1,5 µg Orai1 und 0,5 µg STIM1WT (schwarz) oder STIM1DQ (rot) transfiziert und in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Die externe Ca^{2+} -Lösung enthielt 2 mM Ca^{2+} und kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt. Der Strom wurde durch 50 µM IP_3 in der Pipette induziert. Dargestellt ist die Stromdichte bei -130 mV nach 110s, normiert auf die Zellgröße. B Strom-Spannungs-Kennlinien für die STIM1WT (schwarz) und STIM1DQ (rot) induzierten Ströme, extrahiert aus den Messungen aus A. C HEK293 Zellen beschrieben unter A wurden auf Proteinebene untersucht. Der Proteinblot wurde mit Antikörpern gegen STIM1 und Orai1 inkubiert. Dargestellt ist das Verhältnis von STIM1 über Orai1 Signal.

Selbst wenn man die dreifache Menge von Orai1 gegenüber STIM1DQ transfiziert sind die Ströme signifikant erhöht. Der STIM1DQ induzierte Strom weist eine Stromdichte von -19 pA/pF auf, während der Strom in den STIM1WT transfizierten Zellen eine Stromdichte von 5,5 pA/pF zeigt (siehe Abbildung 22A). Abbildung 22B zeigt die Strom-Spannungs-Kennlinien, welche typisch für I_{CRAC} sind und keine Besonderheiten aufweisen. Die Quantifizierung des Proteinblots zeigt, dass trotz der erhöhten Orai1 Menge bei der Transfektion trotzdem ein Proteinratio von 1,2 für die STIM1DQ transfizierten Zellen entsteht. Die mit dem STIM1WT Protein transfizierten Zellen weisen lediglich ein Verhältnis von 0,1 auf.

Diese und vorherige Experimente zeigen zwar, dass das STIM1 zu Orai1 Proteinverhältnis wichtig für die Stromdichte ist, weisen aber darauf hin, dass das Proteinverhältnis nicht immer ganz genau mit der Stromdichte korreliert werden kann. Zudem erklären diese Experimente nicht die enorme Stromdichte STIM1DQ induzierter Ströme

6.7 STIM1DQ weist eine schnellere Aktivierungskinetik auf

Der Orai1 vermittelte Calciumstrom kann durch Entleerung der internen Calciumspeicher, also dem ER, ausgelöst werden. Experimentell erreicht man dies in whole cell Patch-clamp Messungen dadurch, dass man IP_3 in der Pipette verwendet. Dieses bindet nach dem Austausch des Cytosols mit der Pipettenlösung an den IP_3 -Rezeptor in der ER-Membran und öffnet dadurch die Kanäle, wodurch das ER entleert wird. Dieser Prozess verläuft innerhalb weniger Millisekunden und die Aktivierung des CRAC-Stroms geht direkt damit einher. Eine weitere Möglichkeit den Strom zu aktivieren ist die passive Entleerung der Speicher. Hier enthält die Pipettenlösung einen Ca^{2+} -Chelator wie z.B. EDTA, welcher das Ca^{2+} , das aus dem ER leckt, bindet und so eine langsamere Aktivierung des Kanals mit Zeitverzögerung hervorruft. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Stromaktivierung zeitlich besser aufgelöst werden kann.

Bei der Untersuchung der mittleren Latenzzeit nach passiver Aktivierung von I_{CRAC} fällt auf, dass STIM1DQ den Strom deutlich schneller aktivieren kann, als das STIM1WT Protein. Die mittlere Latenzzeit in Abbildung 23B liegt für STIM1WT transfizierte Zellen bei 153,58 s und bei STIM1DQ transfizierten Zellen bei 96,63 s und ist damit signifikant reduziert. Die kumulative Auftragung in Abbildung 23C zeigt, dass innerhalb kürzerer Zeit viel mehr STIM1DQ transfizierte Zellen aktivieren. Transfiziert man nun 6 μ g STIM1DQ DNA, so verändert dies die Latenzzeit zur Stromaktivierung nicht weiter. Die erhöhte Menge an STIM1WT Protein allerdings, reduziert die Latenzzeit sehr deutlich. Dies weist darauf hin, dass bei STIM1DQ anscheinend auch nach der Transfektion von lediglich 1,5 μ g STIM1DQ eine nicht steigerbare Menge an STIM1 Protein pro Orai1 Kanal für die optimale Aktivierung zur Verfügung steht.

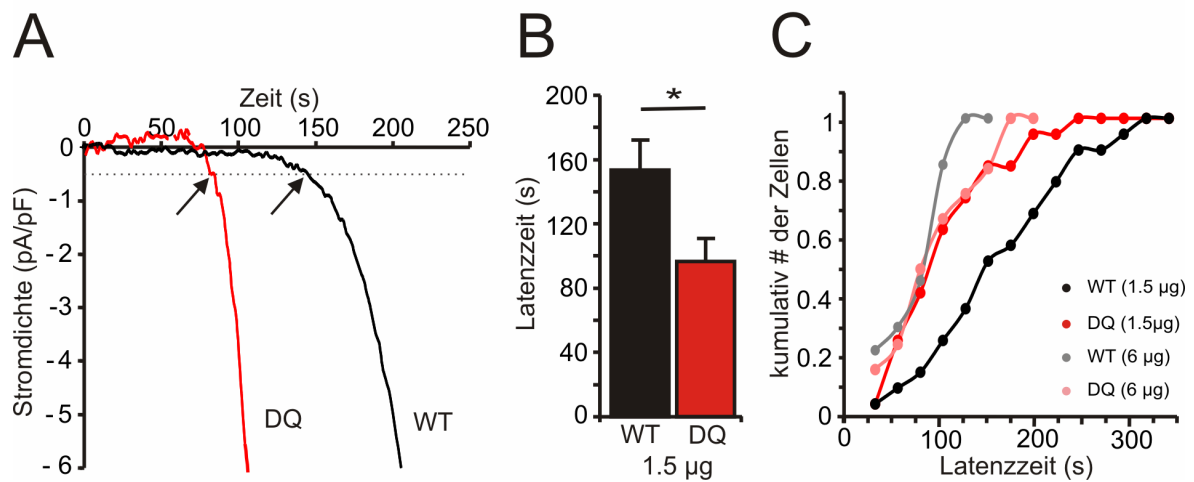


Abbildung 23: Die STIM1DQ Mutante aktiviert I_{CRAC} schneller, eine Erhöhung der STIM1WT Proteinnmenge kann diesen Effekt allerdings imitieren. **A** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 µg Orai1 und 1,5 µg STIM1WT (schwarz) bzw. STIM1DQ (rot) transfiziert und anschließend in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Die externe Lösung enthielt 2 mM Ca^{2+} und die Ströme wurden passiv durch 10 mM EGTA in der Pipettenlösung aktiviert. Kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt. Dargestellt sind zwei Beispielmessungen in denen die auf die Zellgröße normierte Stromdichte gegen die Zeit aufgetragen ist. Die Zeitspanne, die benötigt wird, um eine Stromdichte über dem Schwellenwert von 0,5 pA/pF zu erreichen (siehe Pfeile), gilt als Latenzzeit **B** Mittlere Latenzzeit aller Messungen aus **A**. **C** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 µg Orai1 und 1,5 oder 6 µg STIM1WT bzw. STIM1DQ transfiziert und anschließend in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Die externe Lösung enthielt 2 mM Ca^{2+} und die Ströme wurden passiv durch 10 mM EGTA in der Pipettenlösung aktiviert. Kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt. Dargestellt ist die kumulative Auftragung aktivierter Zellen in Abhängigkeit von der Latenzzeit. Hierzu wurde die Latenzzeit in Blocks von 25 s unterteilt und alle Zellen, die innerhalb dieser Blocks aktivierten, in Gruppen zusammengefasst und entsprechend aufgetragen.

Wenn die internen Calciumspeicher der Zellen entleert werden, so verliert das in der ER Membran sitzende STIM1 Molekül das in der EF-Hand gebundene Ca^{2+} . Dies ist der initiale Schritt der CRAC Kanal Aktivierung. Die bis dahin monomeren STIM1 Moleküle bilden Dimere und Oligomere und wandern in PM nahe Bereiche um dort die Orai Kanäle zu aktivieren. Da die Latenzzeit bis zur Stromentwicklung vermutlich von der Fähigkeit der Clusterbildung von dem STIM1 Protein abhängt, sollte diese mittels der TIRF Mikroskopie untersucht werden. Die STIM1 Cluster sind nach Aktivierung als so genannte Puncta in der TIRF-Ebene zu erkennen. Zur Untersuchung der STIM1 Clusterbildung wurden STIM1WT und STIM1DQ Mutanten mit einem N-terminalen YFP Tag versehen und transient transfiziert. Nach Speicherentleerung mit Tg konnte die Clusterbildung in der TIRF-Ebene untersucht und verglichen werden. Patch-clamp Experimente in Abbildung 24A zeigen, dass die STIM1 Konstrukte trotz des N-terminalen Fluoreszenztags noch funktionell sind und die STIM1DQ Mutante einen signifikant vergrößerten Calciumeinstrom induziert. Auch lässt sich durch die Strommessungen zeigen, dass die getaggten Mutanten nicht konstitutiv aktiv sind.

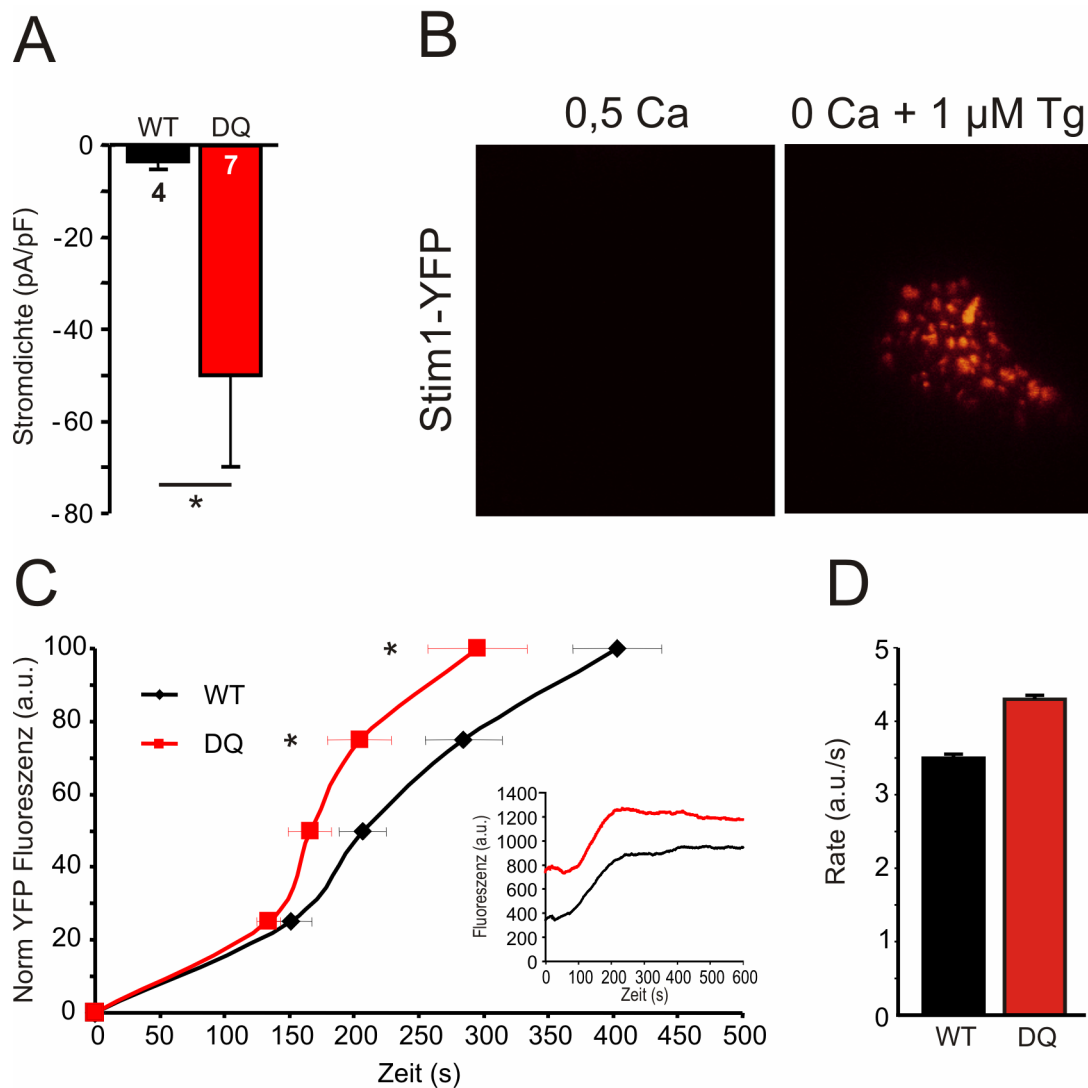


Abbildung 24: Das STIM1DQ Protein clustert nach Speicherentleerung schneller. **A** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μg Orail und 1,5 μg STIM1WT (N) YFP (schwarz) bzw. STIM1DQ (N) YFP (rot) transfiziert und anschließend in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt. Der Strom wurde durch 50 μM IP_3 in der Pipette aktiviert und die externe Lösung enthielt zwei mM Ca^{2+} . Dargestellt ist die Stromdichte nach 110 s bei -130 mV, normiert auf die Zellgröße **B** Die Zellen aus **A** wurden mittels TIRF Mikroskopie untersucht. Dargestellt ist eine Aufnahme zu Beginn der Messung, wenn sich die Zellen in 0,5 Ca^{2+} befinden, und eine zum Ende der Messung, nachdem die Zellen für zehn Minuten in 0 mM Ca^{2+} + 1 μM Tg gehalten wurden. **C** Untersuchung der Clusterbildung in den unter **A** beschriebenen Zellen. Auftragung der Fluoreszenzintensität in PM nahen Regionen nach Aktivierung der Clusterbildung mit 0 mM Ca^{2+} + 1 μM Tg gegen die Zeit. Im Insert ist die Entwicklung der mittleren Fluoreszenzintensität aller gemessener Zellen gegen die Zeit aufgetragen. **D** Der exponentiell ansteigende Teil der Kinetik im Insert von **B** wurde mit einer linearen Funktion gefittet. Aufgetragen ist die Rate des Anstiegs der Fluoreszenzintensität.

Die TIRF Analysen zeigen, dass das STIM1DQ Protein nach Speicherentleerung schneller clustern kann als das STIM1WT Protein. Bereits 160 s nach Zugabe von Tg sind im Fall von STIM1DQ 50 % der finalen Fluoreszenzintensität erreicht, während das STIM1WT Protein hierzu 210 s benötigt (siehe Abbildung 24C). Die Rate des Fluoreszenzanstiegs, dargestellt in Abbildung 24D, ist demnach für das STIM1DQ Protein mit 4,4 a.u./s gegenüber dem STIM1WT Protein mit 3,5 a.u./s erhöht. Auffällig ist auch die erhöhte PM nahe Fluoreszenz der STIM1DQ transfizierten Zellen in 0,5 mM Ca^{2+} -Lösung (siehe Abbildung 24C Insert). Während die STIM1WT transfizierten Zellen eine Grundfluoreszenzintensität von etwa 400 aufweisen, liegt diese bei den STIM1DQ transfizier-

ten Zellen schon bei etwa 800. Dies bedeutet, dass das STIM1DQ Protein bereits vor der Speicherentleerung vermehrt in PM nahen Regionen auftritt oder schon vorgeclustert ist.

6.8 Kann plasmamembranständiges STIM1DQ den Orail vermittelten Calciumstrom beeinflussen?

Nach Durchführung mehrerer Biotinylierungsexperimente fällt auf, dass die Proteinmenge der STIM1DQ Mutante assoziiert oder in der Plasmamembran gegenüber der des STIM1WT Proteins leicht erhöht ist. Williams et al zeigten bereits, dass die Glykosylierung von STIM1 eine Funktion für die Plasmamembranlokalisation spielt, und so sollte untersucht werden, ob die STIM1DQ Mutante durch verstärkte Lokalisation in der PM einen Einfluss auf die Stromdichte von I_{CRAC} haben könnte. Hierzu wurden die Konstrukte von STIM1WT und STIM1DQ mit einem ER-Retentionsmotif (FQ) versehen.

Zunächst wurde die Effektivität des Retentionsmotifs mit Hilfe eines CD4-Konstrukts und einer STIM1-CD4-Chimere getestet. Das humane CD (Cluster of differentiation) 4 ist ein Glykoprotein mit einer Transmembrandomäne, das in den menschlichen Zellen des Immunsystems exprimiert wird und ausschließlich in der PM lokalisiert. Der Aufbau der STIM1-CD4-Chimere ist in Abbildung 25 dargestellt. Hierbei handelt es sich um ein STIM1 Molekül in dem lediglich die Transmembrandomäne von CD4 eingefügt ist. Dieses Konstrukt ist sowohl im ER als auch in der PM lokalisiert.

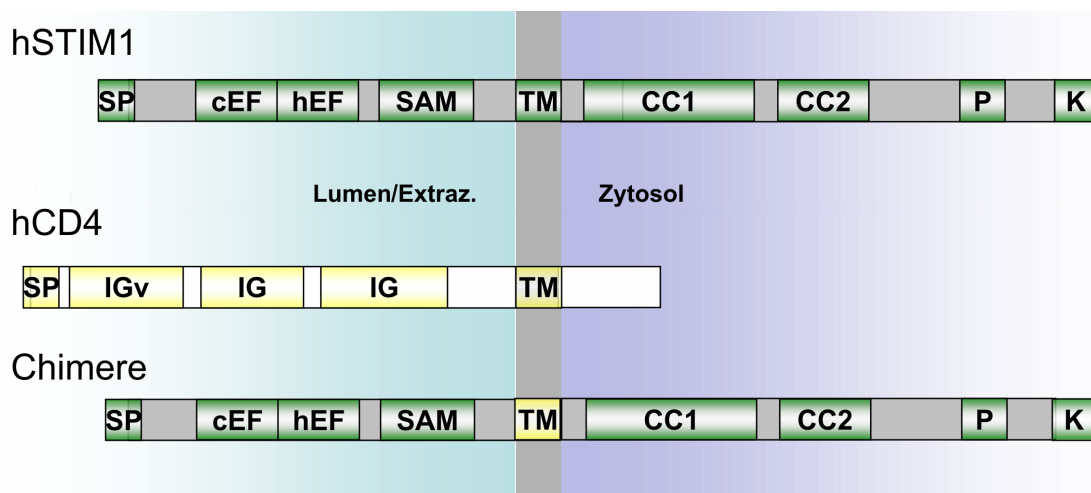


Abbildung 25: Übersichtsskizze über den Aufbau der STIM1-CD4-Chimeren. Schematische Darstellung des STIM1 Proteins mit folgenden Domänen: SP Signalpeptid; cEF und hEF Ca^{2+} - Bindedomänen; SAM Protein Interaktionsdomäne; TM Transmembrandomäne; CC1 und CC2 Coiled-coil Orail Bindedomänen; P Prolin- reiche Region; K poly Lysin- reiche Region. Schematische Darstellung des CD4 Proteins mit folgenden Domänen: SP Signalpeptid; IG immunglobulinartige Region, TM Transmembrandomäne. Im chimere Protein ist lediglich die TM des STIM1 Moleküls gegen die des CD4 Moleküls ausgetauscht.

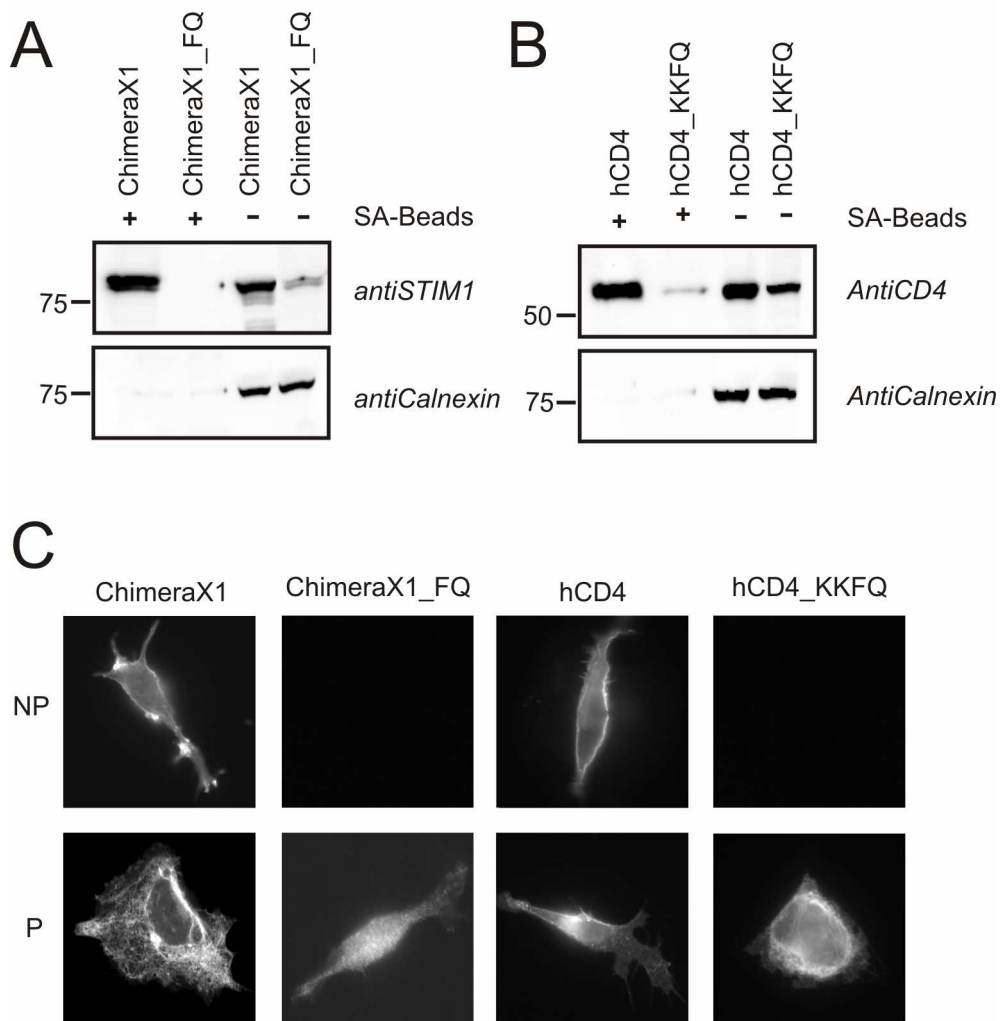


Abbildung 26: Das KKFQ- Motif retentiert Proteine im ER. A+B HEK293 Zellen wurden mit 1,5 µg STIM1-Chimere, STIM1-ChimereFQ, hCD4 oder hCD4_KKFQ transfiziert und 48 h nach Transfektion in einem Biotinylierungsexperiment untersucht. Dargestellt ist der Originalblot inkubiert mit Antikörpern gegen STIM1, CD4 oder Calnexin, wobei jeweils die ersten beiden Reihen die Proteinfraction in der Plasmamembran widerspiegeln und die beiden anderen Reihen die Inputkontrolle vor Inkubation mit den Beads und damit das Gesamtprotein darstellen. C Immunhistochemische Färbungen von Zellen transfiziert wie angegeben unter A+B. Die Zellen wurden mit einem Alexa 488 gekopplten anti-HA-Antikörper gefärbt und fixiert (NP) bzw. zuerst permeabilisiert und dann gefärbt und fixiert (P).

Nach Anhängen des KKFQ- Retentionsmotifs an die STIM1-CD4 Chimere und das CD4 Molekül konnte keine PM- Lokalisation mehr nachgewiesen werden. Nach Färbung nicht permeabilisierter Zellen (siehe Abbildung 26C) ist keine Fluoreszenz mehr erkennbar. Auch im Biotinylierungsexperiment, gezeigt in Abbildung 26A+B, kann die ER-Retention gezeigt werden. Die PM- ständige Fraktion der Proteine ist im Fall der Chimere vollständig und im Fall von CD4 fast vollständig verschwunden. Die AntiCalnexin Ladekontrolle zeigt nach Behandlung mit den Beads keine Bande, da das Calnexin kein PM ständiges Protein darstellt. Da somit gezeigt werden konnte, dass das ER Retentionsmitf seine Funktion erfüllt, wurden die STIM1WT und STIM1DQ Konstrukte mit dem FQ- Motif versehen und zunächst proteinbiochemisch untersucht.

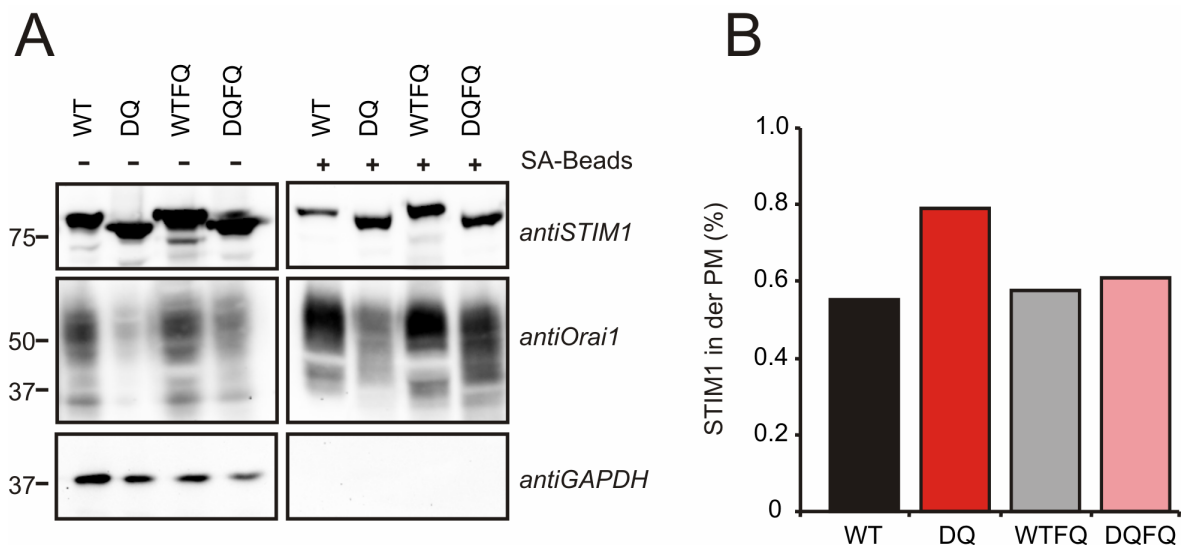


Abbildung 27: Das FQ- Motif reduziert die STIM1DQ Proteinmenge in der PM. HEK293 Zellen wurden mit 0,5 µg Orai1 und 1,5 µg STIM1WT, STIM1DQ, STIM1WTFQ bzw. STIM1DQFQ transfiziert und 48 h nach Transfektion in einem Biotylierungsexperiment untersucht. **A** Dargestellt ist der Originalblot inkubiert mit Antikörpern gegen STIM1, Orai1 oder GAPDH, wobei die ersten vier Reihen die Inputkontrolle vor Inkubation mit den Beads und damit das Gesamtprotein darstellen und die anderen Reihen die Proteinfraction in der Plasmamembran widerspiegeln. **B** Die entsprechende quantitative Analyse, in der die STIM1 Proteinmenge in der Plasmamembran als prozentualer Anteil des Gesamtproteins berechnet wurde.

Das Biotinylierungsexperiment in Abbildung 27 zeigt, dass insgesamt mehr STIM1DQ Protein in der PM ist, als STIM1WT Protein. Nach Anhängen des ER- Retentionsmotifs reduziert sich die Menge an STIM1DQ in der PM auf den Level des STIM1WT und STIM1WTFQ Proteins, wobei das FQ-Motif keinen Einfluss auf die Proteinfraction von STIM1WT in der PM hat. Es wird zudem deutlich, dass die Proteinfraction des STIM1 Proteins in der Plasmamembran lediglich einen verschwindend kleinen Prozentsatz von weniger als 1 % des Gesamtproteins ausmacht. Da GAPDH kein PM ständiges Protein darstellt, eignet es sich als Kontrollprotein um unspezifische Binding an die Avidin Agarose auszuschließen.

Die entsprechenden Konstrukte wurden dann auch in Patch-clamp und Calciumimagingexperimenten untersucht. Zudem wurden Konstrukte von STIM1WT und STIM1DQ hergestellt in denen das C-terminal gelegene KK-Motif entfernt wurde. Diese Konstrukte wurden benötigt um zu kontrollieren, ob der Effekt der FQ Addition eventuell auf eine Maskierung der terminalen Lysine beruht. Die terminalen Lysine sind zur Verankerung des STIM1 C-terminus an die PM wichtig und werden für eine effiziente Aktivierung von Orai1 benötigt (Pani et al, 2009, Zeng et al, 2008).

Die Patch-clamp Experimente zeigen, dass das KKFQ- Motif den STIM1WT induzierten Strom von -23,35 pA/pF auf -17,04 pA/pF reduziert. Die Stromdichte der STIM1DQ transfizierten Zellen wird durch das Motif von -76,04 pA/pF auf -33,83 pA/pF signifikant reduziert (siehe Abbildung 28A). Die Fura 2AM basierenden Calciumimagingexperimente in Abbildung 28B unterstreichen die vorherigen Ergebnisse. Der maximale Calciumeinstrom wird durch das ER- Retentionsmotif mit STIM1WT von 52,03 nM Ca^{2+}/s auf 24,77 nM Ca^{2+}/s und mit STIM1DQ von 57,32 nM Ca^{2+}/s auf 12,57 nM Ca^{2+}/s signifikant erniedrigt. Die Stromdichte zwischen dem STIM1WTFQ und dem STIM1DQFQ induziertem Strom ist nicht mehr signifikant verschieden. Die Deletion der C- terminalen Lysine bewirkt ebenfalls in beiden Konstrukten eine Verringerung der Stromdichte (siehe Abbildung 28C). Die STIM1WTΔKK Mutante induziert einen Strom von -9,93 pA/pF und das

STIM1DQ Δ KK Konstrukt einen Strom von -32,29 pA/pF. In diesen Konstrukten besteht immer noch der signifikante Unterschied in der Stromdichte zwischen dem STIM1WT Δ KK und dem STIM1DQ Δ KK induzierten Strom. Der STIM1DQ Effekt ist in beiden Fällen, nach Anhängen des KKFQ-Signals, als auch nach Entfernung der N-Terminalen Lysine Δ KK, verschwunden. Allerdings reduziert die Entfernung der N-terminalen Lysine auch die STIM1WT vermittelten Ströme signifikant, wobei das KKFQ-Motif diese Ströme nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse bestätigen zum einen, dass die N-terminalen Lysine des STIM1 Moleküls wichtig für die optimale Aktivierung des Orai Kanals sind, und zum anderen sprechen die Ergebnisse dafür, dass das STIM1DQ Molekül in der Plasmamembran eine Rolle bei der Aktivierung des CRAC Stroms haben könnte.

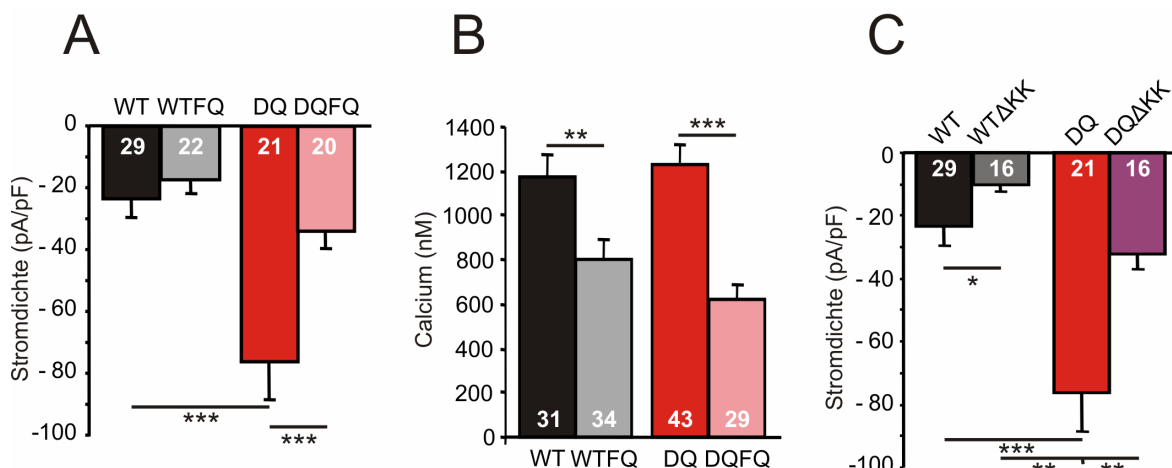


Abbildung 28: Das KKFQ-Motif, aber auch die Deletion C-terminaler Lysine, verkleinern I_{CRAC} . **A** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μ g Orai1 und 1,5 μ g STIM1WT, STIM1DQ, STIM1WTFQ bzw. STIM1DQFQ transfiziert und anschließend in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt. Der Strom wurde durch 50 μ M IP₃ in der Pipette aktiviert und die externe Lösung enthielt 2 mM Ca²⁺. Dargestellt ist die Stromdichte bei -130 mV, normiert auf die Zellgröße. **B** Zellen aus A wurden auch in Fura 2AM basierenden Calciumionenkonzentrationsmessungen mit dem Ca²⁺- Readdition Protokoll untersucht. Die Zellen befanden sich zu Beginn der Messung für 100 s in einer 0,5 mM Ca²⁺-Lösung. Anschließend wurden die Zellen mit einer Ca²⁺-freien Lösung perfundiert und weitere 300 s gemessen. Die Speicher wurden durch Zugabe von 1 μ M Thapsigargin in Ca²⁺-freier Lösung entleert (1000 s) und dann wurde der Calciumeinstrom über Kanäle in der Plasmamembran nach Perfusion mit 0,5 mM Ca²⁺-haltiger Lösung bestimmt (600 s). Statistisch ausgewertet und dargestellt ist der maximale Calciumeinstrom. **C** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μ g Orai1 und 1,5 μ g STIM1WT, STIM1DQ, STIM1WT Δ KK bzw. STIM1DQ Δ KK transfiziert und anschließend in whole cell Patch-clamp Experimenten wie unter A beschrieben untersucht.

6.9 Die Interaktion von STIM1DQ mit Orai1 ist nicht verändert

Mittels des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) sollte untersucht werden, ob die Interaktion von STIM1WT oder STIM1DQ mit Orai1 unterschiedlich ist. Diese Methode erlaubt es die Nähe, und damit die Interaktion von zwei verschiedenen Proteinen miteinander, zu untersuchen. Hierzu wurde das Orai1 Protein C-terminal mit einem GFP-Tag und die STIM1 Proteine C-terminal mit RFP-Tags versehen.

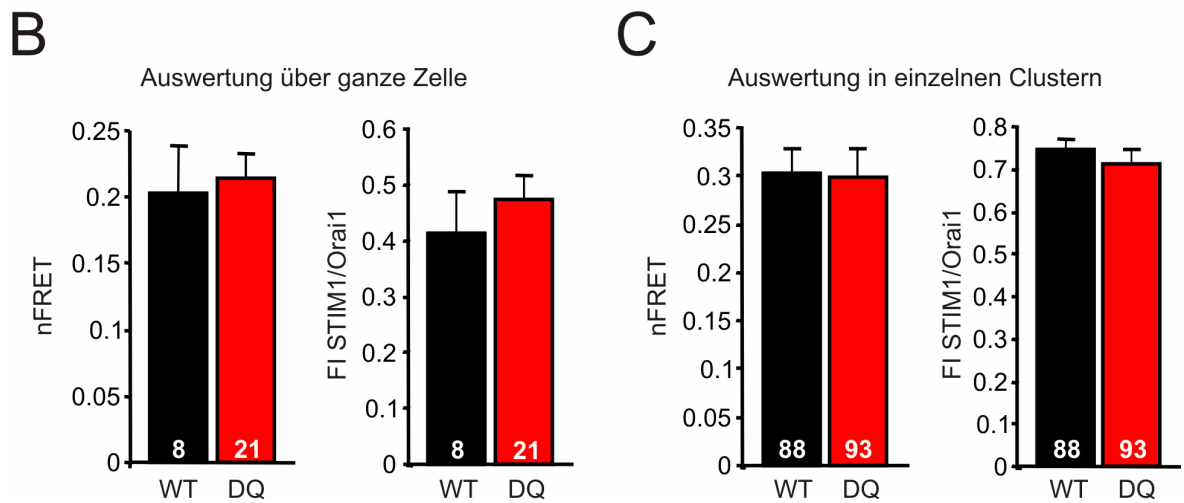
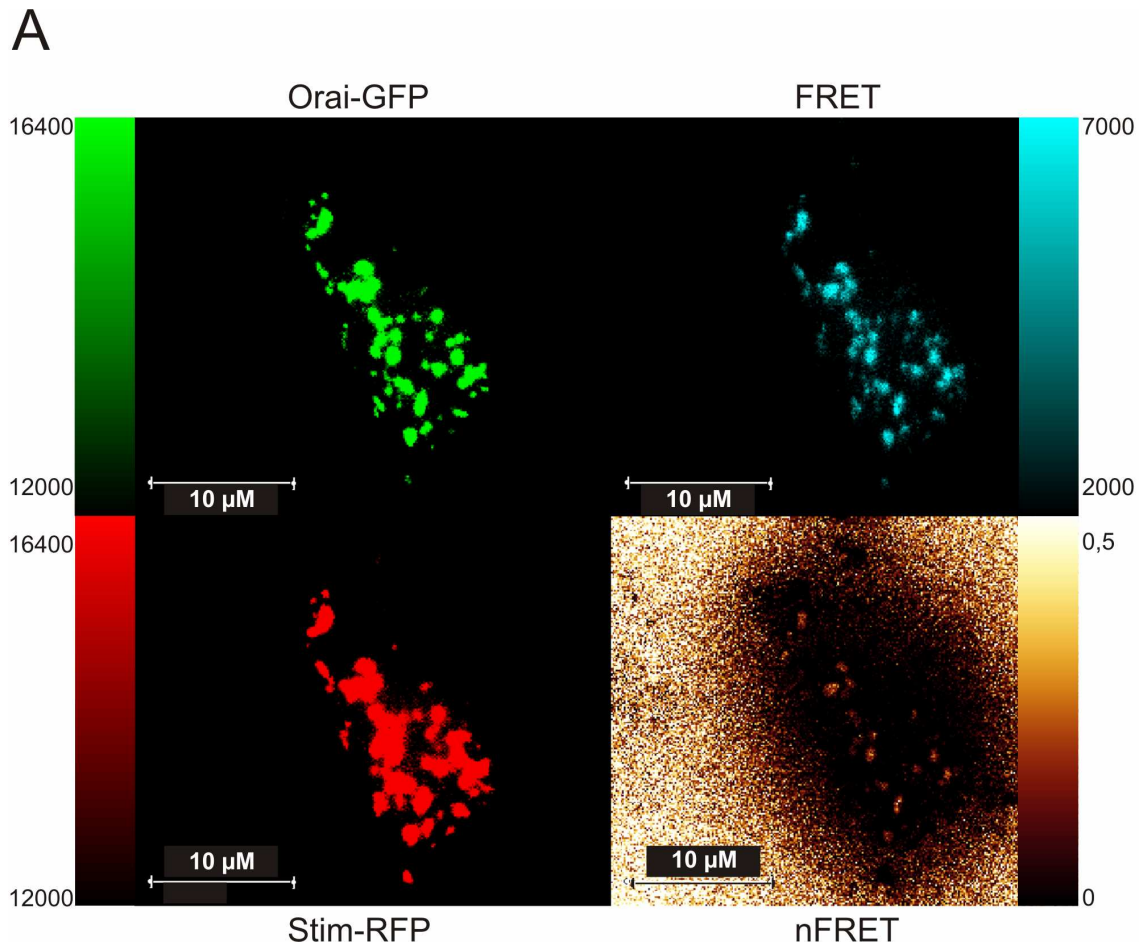


Abbildung 29: Die Interaktion von STIM1WT (C) RFP und STIM1DQ (C) RFP mit Orai1 (C) GFP ist nicht verschieden. **A.** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μ g Orai1 (C) GFP und 1,5 μ g STIM1WT (C) RFP (schwarz) bzw. STIM1DQ (C) RFP (rot) transfiziert und anschließend in FRET Experimenten untersucht. Zur Induktion des Clusterings wurden die Zellen zehn Minuten in einer Lösung ohne Calcium und mit 1 μ M Tg inkubiert. Dargestellt sind die Aufnahmen einer Zelle nach Anregung mit dem 488 nm Laser in Kombination mit einem GFP Filter (Donor), dem 488 nm Laser in Kombination mit einem RFP-Filter (FRET) und einem 561 nm Laser in Kombination mit einem RFP-Filter (Akzeptor) und ein normalisiertes FRET Bild (siehe 5.8). **B** Im normalisierten FRET (nFRET) Bild wurde ein ROI (region of interest) über die gesamte Zelle gelegt und das arithmetische Mittel der FRET-Intensität bestimmt, wobei alle Nullwerte ignoriert wurden. Zudem wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten (FI) von STIM1 und Orai1 in denselben Bereichen bestimmt. **C** Im normalisierten FRET Bild wurden pro Zelle zehn ROIs (region of interest) über einzelne Cluster gelgt und das arithmetische Mittel der FRET-Intensität bestimmt, wobei alle Nullwerte ignoriert wurden. Zudem wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten (FI) von STIM1 und Orai1 in denselben ROIs bestimmt.

Die FRET Analysen in Abbildung 29 zeigen, dass der normalisierte FRET Wert, d.h. die Interaktion zwischen STIM1 und Orai1, in den STIM1WT und STIM1DQ transfizierten Zellen nicht verschieden ist. Zudem ist das STIM1 zu Orai1 Ratio, welches anhand der Fluoreszenzintensität in der TIRF Ebene bestimmt werden kann, kaum unterschiedlich. Bestimmt man den normalisierten FRET Wert über die gesamte Zelle, so erhält man einen Wert von 0,20 für die mit STIM1WT transfizierten Zellen und von 0,21 für die STIM1DQ transfizierten Zellen. Das STIM1 zu Orai1 Ratio beträgt für STIM1WT 0,41 und für STIM1DQ 0,47. In den einzelnen Clustern liegt nFRET bei 0,30 und STIM1 zu Orai1 Ratio bei 0,71 für STIM1WT. Für STIM1DQ wird ein nFRET von 0,299 und ein STIM1 zu Orai1 Ratio von 0,74 erreicht.

Zudem sollte untersucht werden, ob die Interaktion der STIM1WT Moleküle oder der STIM1DQ Moleküle während des Clustervorganges untereinander verschieden ist. Hierzu wurden die Zellen mit STIM1WT (C) GFP und STIM1WT(C)RFP bzw. STIM1DQ (C) GFP und STIM1DQ(C)RFP transfiziert und untersucht.

Analysiert man die Interaktion von STIM1DQ mit STIM1DQ in der Abwesenheit von Orai1 über die gesamte Zelle oder in den einzelnen Clustern, so ist diese tendenziell etwas höher als die STIM1WT-STIM1WT Interaktion. In der Anwesenheit von Orai1 ergeben sich allerdings keinerlei Unterschiede in der STIM-STIM Interaktion. Weder bei der Bestimmung von nFRET über die gesamte Zelle, noch bei der Clusteranalyse.

Zu beachten ist, dass das C-terminal getaggte STIM1 kaum noch in der Lage ist einen adäquaten Orai1 vermittelten Calciumstrom zu aktivieren und, dass der STIM1DQ Phänotyp nicht mehr vorhanden ist.

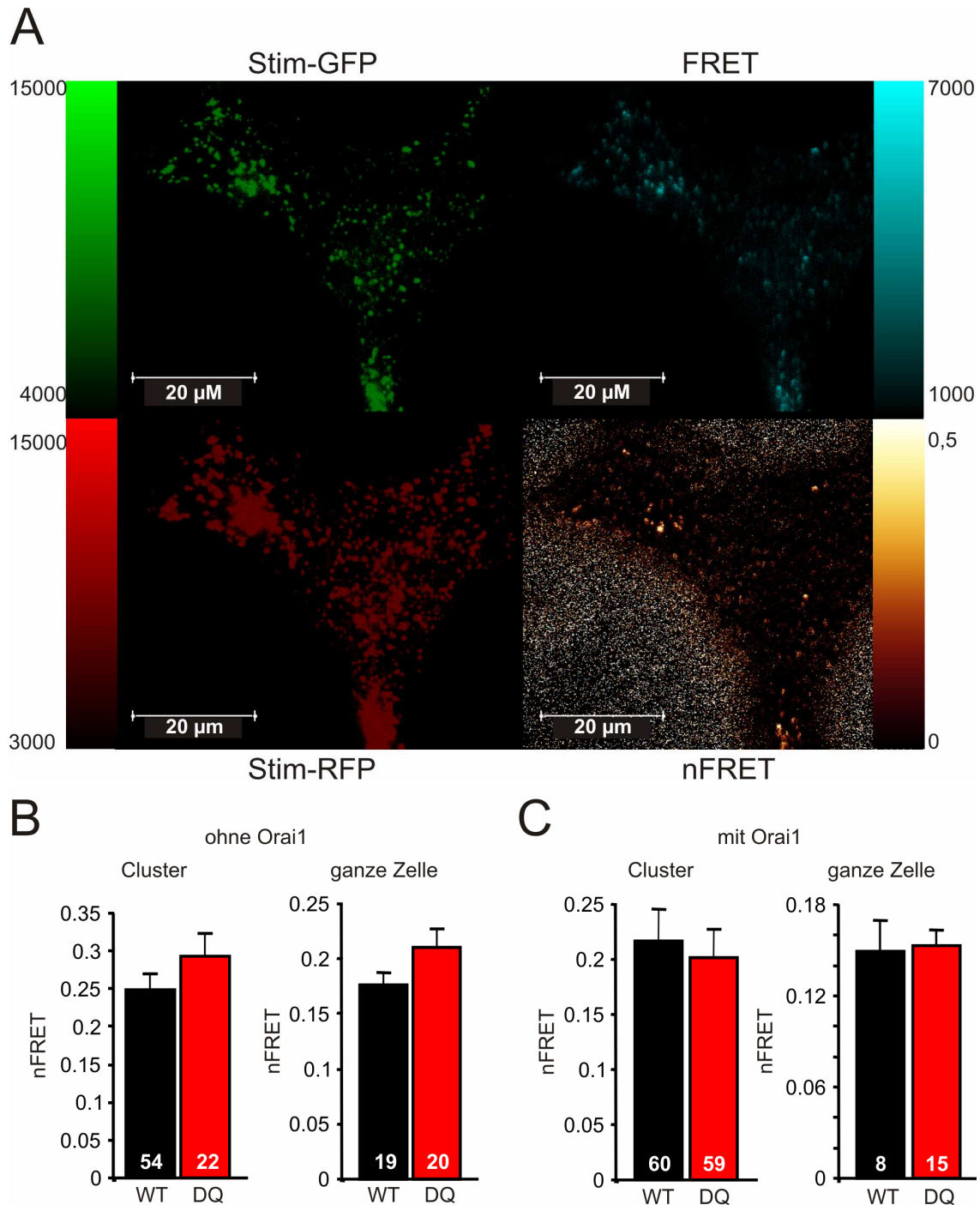


Abbildung 30: Die Interaktion von STIM1WT- bzw. STIM1DQ-Molekülen beim Clustering ist nicht verschieden. **A** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μ g Orai1 MO700GFP und 1,5 μ g STIM1WT (C) RFP und 1,5 μ g STIM1WT (C) GFP (schwarz) bzw. STIM1DQ (C) RFP und STIM1DQ (C) GFP (rot) transfiziert und anschließend in FRET Experimenten untersucht. Zur Induktion des Clusterings wurden die Zellen zehn Minuten in einer Lösung ohne Calcium und mit 1 μ M Tg inkubiert. Dargestellt sind die Aufnahmen einer Zelle nach Anregung mit dem 488 nm Laser in Kombination mit einem GFP Filter (Donor), dem 488 nm Laser in Kombination mit einem RFP-Filter (FRET) und einem 561 nm Laser in Kombination mit einem RFP-Filter (Akzeptor) und ein normalisiertes FRET Bild (siehe 5.8). **B** Hier wurden Zellen nur mit 0,5 μ g STIM1WT (C) RFP und 1,5 μ g STIM1WT (C) GFP (schwarz) bzw. STIM1DQ (C) RFP und STIM1DQ (C) GFP (rot), aber ohne Orai1, transfiziert. Im normalisierten FRET Bild wurde ein ROI (region of interest) entweder über die gesamte Zelle bzw. über zehn verschiedene Cluster pro Zelle gelegt und das arithmetische Mittel der FRET-Intensität bestimmt, wobei alle Nullwerte ignoriert wurden. **C** Hier wurden Zellen mit 0,5 μ g Orai1 MO700GFP und 1,5 μ g STIM1WT (C) RFP und 1,5 μ g STIM1WT (C) GFP (schwarz) bzw. STIM1DQ (C) RFP und STIM1DQ (C) GFP (rot) transfiziert. Im normalisierten FRET Bild wurde ein ROI (region of interest) entweder über die gesamte Zelle bzw. über zehn verschiedene Cluster pro Zelle gelegt und das arithmetische Mittel der FRET-Intensität bestimmt, wobei alle Nullwerte ignoriert wurden.

6.10 STIM1DQ amplifiziert den Orai2 vermittelten, aber nicht den Orai3 vermittelten Calciumstrom

Um herauszufinden, ob der STIM1DQ Phänotyp für den Orai1 vermittelten Calciumstrom spezifisch ist, wurden HEK293 Zellen mit Orai2, Orai3 und einer Orai1-Orai3 Chimere transfiziert und elektrophysiologisch untersucht. Bei Orai2 und Orai3 handelt es sich um zwei dem Orai1 Protein homologe Proteine. Obwohl sich die DNA-Sequenzen der drei Proteine kaum unterscheiden, weisen sie dennoch unterschiedliche Eigenschaften bezüglich Stromdichte, Ca^{2+} -abhängiger Inaktivierung oder dem 2-APB-Profil auf (Varnai et al, 2009). Lis et al. konnten auch zeigen, dass der N-Term von Orai1 und Orai3 wichtig für die Aktivierung durch STIM1 ist, weshalb in der vorliegenden Arbeit die bereits erwähnte N-Term Chimere zwischen Orai1 und Orai3 verwendet wurde (Lis et al, 2010).

Die Stromentwicklung von den STIM1WT und STIM1DQ induzierten Orai2 vermittelten CRAC Strömen in Abbildung 31A unterscheidet sich nicht, wobei die finale Stromdichte nach Kointransfektion mit STIM1DQ signifikant erhöht ist. Die Stromdichte beträgt mit STIM1WT -5,95 pA/pF und mit STIM1DQ -10,70 pA/pF (siehe Abbildung 31G). Die Orai3 vermittelten Ströme gezeigt in Abbildung 31B hingegen, sind in den STIM1DQ transfizierten Zellen kleiner, als in den STIM1WT transfizierten Zellen. Hier liegt die Stromdichte STIM1WT induzierter Ströme bei -8,17 pA/pF und die der STIM1DQ induzierten Ströme bei lediglich -5,88 pA/pF (siehe Abbildung 31G). Die Auswärtsströme sind sehr klein und in beiden Fällen gleich, auch die Strom-Spannungs-Kennlinien sind lediglich in der Amplitude verschoben.

Untersucht man nun aber die Ströme durch einen chimären Orai3 Kanal, in dem lediglich der N-Term durch den von Orai1 ersetzt wurde, so ist die STIM1DQ Mutante wieder in der Lage die Stromdichte signifikant zu erhöhen. Der STIM1WT induzierte Strom liegt bei -29,04 pA/pF und der STIM1DQ induzierte bei -58,37 pA/pF (siehe Abbildung 31C+G). Die erhöhte Stromdichte scheint von der Interaktion zwischen dem C-Term von STIM1DQ und dem N-Term von Orai abhängig zu sein.

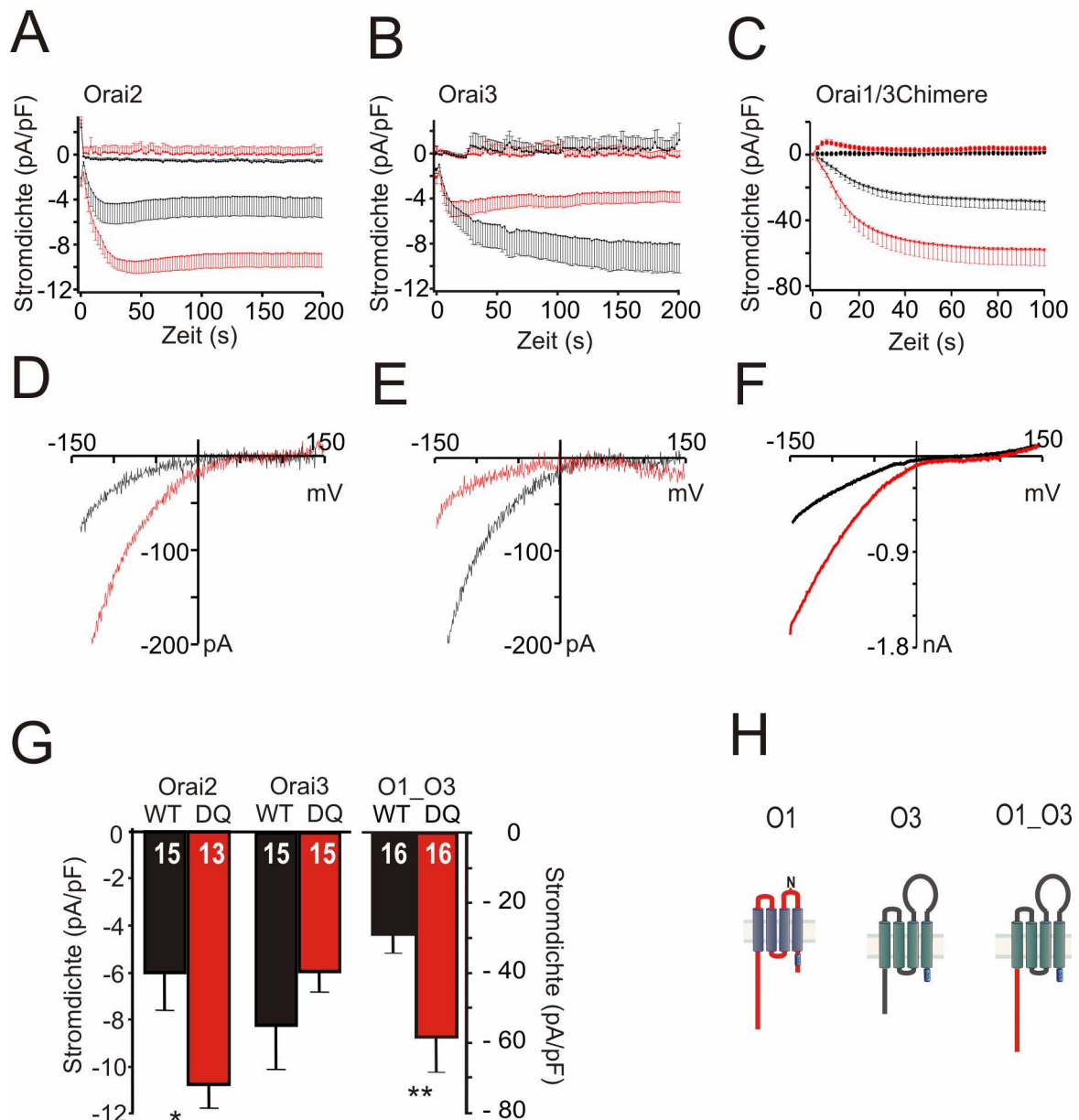


Abbildung 31: Die erhöhte Stromdichte von STIM1DQ induzierten CRAC Strömen ist abhängig von der Interaktion zwischen STIM1 und Orai1. A-C HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μg Orai2, Orai3 oder einer O1-O3-Chimeren und 1,5 μg STIM1WT (schwarz) bzw. STIM1DQ (rot) transfiziert und anschließend in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt und die externe Lösung enthielt 2 mM Ca^{2+} . Dargestellt ist die Entwicklung der Stromdichte bei -130 mV, normiert auf die Zellgröße, über die Zeit. D-F Strom-Spannungs-Kennlinien für die STIM1WT (schwarz) und STIM1DQ (rot) induzierten Ströme, extrahiert aus den entsprechenden Messungen aus A-C. G Vergleichende Darstellung der Stromdichte aus den Messungen A-C. Die Stromdichte wurde bei -130 mV nach 110s extrahiert und auf die Zellgröße normiert. H Schematische Darstellung des Orai1 und Orai3 Kanals, sowie der Orai1-Orai3-Chimeren. Der chimere Kanal ist ein Orai3 Protein in dem lediglich der N-Term durch den von Orai1 ausgetauscht ist.

Im Western Blot in Abbildung 32 zeigt sich, dass das STIM1DQ Protein auch in der Lage ist die Proteinmenge der Orai1_Orai3- Chimeren zu reduzieren. Das STIM1:Orai Verhältnis verschiebt sich von 2 a.u. für STIM1WT auf 3,5 a.u. für STIM1DQ. Der Nachweis des Orai2 und Orai3 Proteins auf einem Blot war nicht möglich.

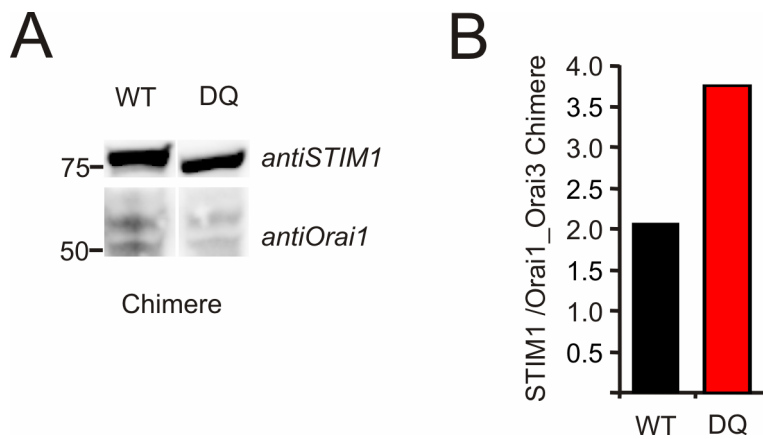


Abbildung 32: STIM1DQ reduziert auch die Proteinmenge einer Orai1_Orai3- Chimeren. **A** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 µg einer Orai1_Orai3- Chimeren und 1,5 µg STIM1WT (schwarz) oder STIM1DQ (rot) transfiziert und auf Proteinebene untersucht. Der Proteinblot wurde mit Antikörpern gegen STIM1 und Orai1 inkubiert. **B** Quantifizierung des Proteinblots in A. Dargestellt ist das Verhältnis von STIM1 über Orai1.

6.11 Pharmakologisches Profil mit 2-APB

Um mehr über die STIM1DQ induzierten Ströme zu lernen und den Mechanismus zu verstehen wurden HEK293 Zellen mit Orai1, Orai2 oder Orai3 und STIM1WT oder STIM1DQ transfiziert und elektrophysiologisch untersucht. In diesem Teil der vorliegenden Arbeit sollten die Effekte von 2-Aminoethoxydihenylborat (2-APB) untersucht und eventuelle Unterschiede aufgedeckt werden. 2-APB wird häufig verwendet um SOCE pharmakologisch zu untersuchen und zu charakterisieren. Es ist bereits bekannt, dass 2-APB unterschiedliche Effekte in den Orai Subtypen auslöst (Lis et al, 2007; Peinelt et al, 2008b). So werden Orai1 und Orai2 vermittelte CRAC Ströme nach vorheriger Speicherentleerung durch 50 µM 2-APB zunächst verstärkt und dann inhibiert, Orai3 vermittelte Ströme hingegen werden immer verstärkt und die Aktivierung ist nicht speicher- oder STIM1- abhängig. Zudem wird vermutet, dass 2-APB in direkter Konkurrenz mit STIM1 bei der Aktivierung des CRAC Stroms steht (Yamashita et al, 2011). Diese Eigenschaften machen 2-APB zu einem idealen Werkzeug den STIM1DQ induzierten CRAC Strom zu untersuchen.

Hierzu wurden HEK293 Zellen mit STIM1 und Orai1 transfiziert und in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Der CRAC Strom wurde durch IP₃ in der Pipette ausgelöst. Nachdem sich der Strom vollständig entwickelt hatte, wurden 50 µM 2-APB auf die Zellen appliziert.

Die Applikation von 50 µM 2-APB verstärkt den Orai1 vermittelten Strom zunächst kurzfristig und inhibiert ihn anschließend. Abbildung 33A zeigt, dass die Inhibition des Orai1 vermittelten Stroms zusammen mit 6 µg STIM1DQ in zwei Stufen verläuft und sich so von den anderen Messungen unterscheidet. Wenn die Applikation von 50 µM 2-APB gestoppt wird, so entwickelt sich der CRAC Strom wieder, allerdings auf ein niedrigeres Niveau als vor der Applikation. Die Wirkung von 2-APB auf den Orai2 vermittelten Strom, gezeigt in Abbildung 33B+E, liegt in einer Blockade des Calciumstroms. Lediglich wenn die Zellen mit 1,5 µg STIM1WT transfiziert sind, wird der Strom vor der Inhibition verstärkt (siehe Abbildung 33E). Auch hier entwickelt sich der Strom nach Beenden der Applikation von 2-APB wieder. Die so erreichte Stromdichte ist allerdings um ein Vielfaches kleiner, als die Stromdichte vor der Applikation. Der Orai3 vermittelte Strom wird durch 50 µM 2-APB zweiphasisch amplifiziert (siehe Abbildung 33C+F). Zunächst wird der Strom nur um wenige pA verstärkt, bleibt kurz auf einem Plateau und wird dann sehr schnell und sehr stark amplifiziert. Die Plateauphase ist in den Zellen mit 1,5 µg STIM1WT am ausgeprägtesten, ansons-

ten lassen sich in den Messungen keine Unterschiede aufdecken. Der Orai3 vermittelte CRAC Strom entwickelt sich nach der 2-APB Applikation nicht mehr. Hier führt 2-APB insgesamt zu einer Blockade des Calciumstroms.

Mit diesen Experimenten lassen sich keine Effekte spezifisch für eine höhere Menge an STIM1 oder für STIM1DQ aufdecken. Die Unterschiede in dem 2-APB Effekt auf Orai1 (siehe Abbildung 33A) und Orai2 (siehe Abbildung 33E) sind sehr interessant und sollten, da der genaue Mechanismus der 2-APB Wirkung immer noch nicht bekannt ist, in Zukunft näher untersucht werden.

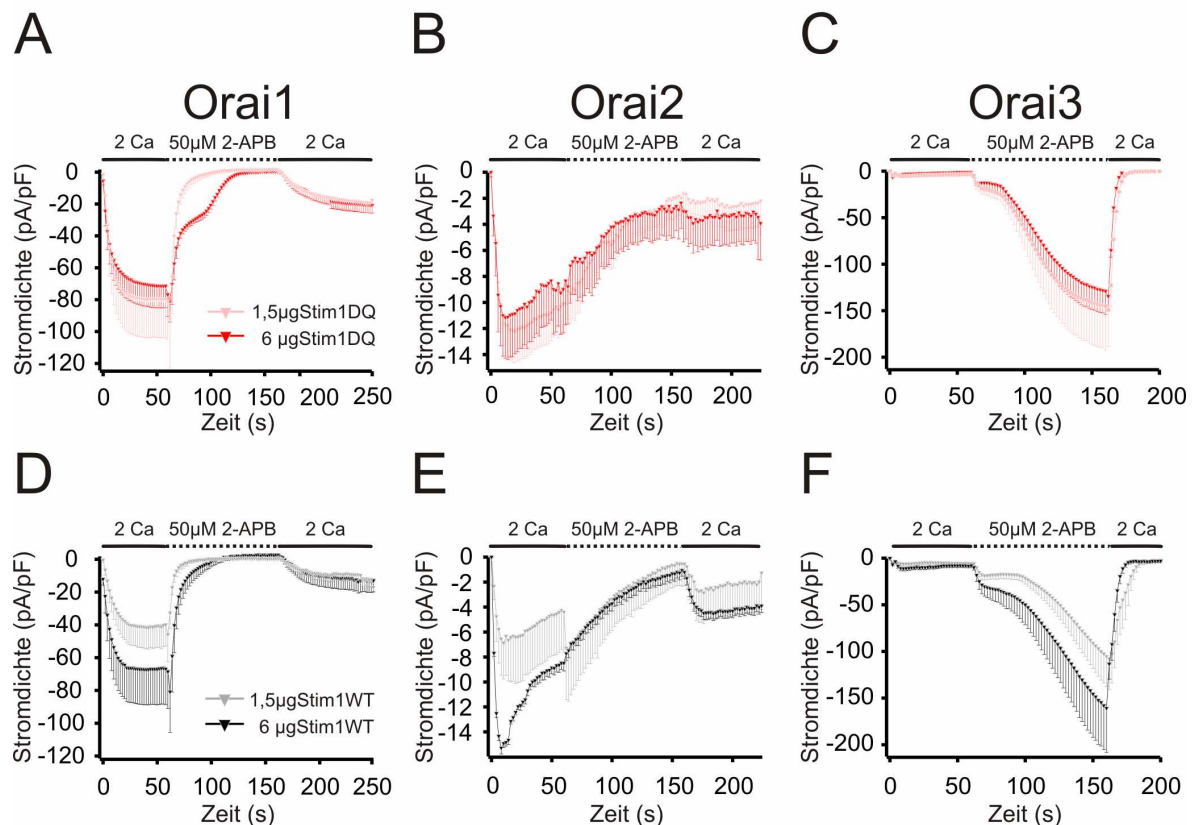


Abbildung 33: 2-APB beeinflusst die Orai1, Orai2 und Orai3 vermittelten Calciumströme unterschiedlich. **A** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μg Orai1 und 1,5 μg oder 6 μg STIM1DQ transfiziert und anschließend in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Die Pipettenlösung enthielt 50 μM IP₃ zur Aktivierung von I_{CRAC}. Die Zellen wurden mit den angegebenen Lösungen perfundiert und kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt. Dargestellt ist die Stromdichte bei -130 mV, normiert auf die Zellgröße, über die Zeit. **B** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μg Orai2 und 1,5 μg oder 6 μg STIM1DQ transfiziert und anschließend wie unter A beschrieben in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. **C** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μg Orai3 und 1,5 μg oder 6 μg STIM1DQ transfiziert und anschließend wie unter A beschrieben in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. **D** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μg Orai1 und 1,5 μg oder 6 μg STIM1WT transfiziert und anschließend wie unter A beschrieben in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. **E** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μg Orai2 und 1,5 μg oder 6 μg STIM1WT transfiziert und anschließend wie unter A beschrieben in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. **F** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μg Orai3 und 1,5 μg oder 6 μg STIM1WT transfiziert und anschließend wie unter A beschrieben in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht.

6.12 Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

Die Untersuchungen zur Bedeutsamkeit der STIM1 Glykosylierung für den speicheraktivierten Calciumeinstrom in Zellen brachte eine glykosylierungsdefiziente gain-of function STIM1 Mutante (STIM1N131DN171Q, kurz STIM1DQ) hervor. Die STIM1DQ Mutante zeichnet sich durch die

Vergrößerung des Orai1 vermittelten Calciumstroms um das etwa Vierfache aus, wobei die anderen Eigenschaften des CRAC Stroms wie z.B. Rektifizierung, Leitfähigkeit oder Inaktivierungskinetik nicht verändert sind. Keine der anderen untersuchten glykosylierungsdefizienten STIM1 Mutanten ist in der Lage diesen Phänotyp zu imitieren, was darauf schließen lässt, dass der STIM1DQ Phänotyp nicht auf die fehlende Glykosylierung *per se* zurückzuführen ist. Es scheint sich vielmehr um einen kombinierten Effekt aus fehlender Glykosylierung zusammen mit veränderter Struktur zu handeln. Mittels biochemischer Methoden konnte gezeigt werden, dass die Kotretransfektion der STIM1DQ Mutante mit Orai1 die Orai1 Proteinkonzentration reduziert. Somit wird das STIM1:Orai1 Proteinverhältnis hin zu einem effektiveren Wert verschoben, so dass insgesamt mehr STIM1 Moleküle zur optimalen Aktivierung des Orai1 Kanals zur Verfügung stehen. Allerdings ist die Veränderung im Proteinverhältnis alleine nicht für den STIM1DQ Phänotyp verantwortlich, da Veränderungen des STIM1WT:Orai1 Verhältnisses keine derart große Stromdichte hervorrufen können. Mit Hilfe der TIRF Mikroskopie und der Patch-clamp Technik konnte gezeigt werden, dass das STIM1DQ Protein nach Speicherentleerung schneller clustert und dadurch den Calcium-einstrom durch den Orai1 Kanal schneller aktivieren kann. Obwohl die FRET Analysen keine veränderte Interaktion zwischen STIM1WT bzw. STIM1DQ und dem Orai1 Protein aufdecken konnten, weisen die Untersuchungen mit Orai2, Orai3 und der Orai1_Orai3-Chimeren auf eine veränderte Interaktion von STIM1DQ mit dem N-Term von Orai1 hin. Das pharmakologische Profil der STIM1WT bzw. STIM1DQ induzierten Calciumströme weist keine Unterschiede auf. Der STIM1DQ Phänotyp scheint durch einen kombinierten Effekt aus verbessertem STIM1:Orai1 Verhältnis und schnellerer Aktivierung zu entstehen.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte nun die Ursache für die Reduktion der Orai1 Proteinkonzentration nach Koexpression mit STIM1DQ untersucht werden. Zudem sollte die glykosylierungsdefiziente Orai1 Mutante untersucht und charakterisiert werden und der Einfluss veränderter Glykosylierungsmuster in primären humanen CD4⁺ T-Zellen sollte betrachtet werden.

6.13 Wie kommt die Reduktion der Orai1 Proteinkonzentration nach Kotretransfektion mit STIM1DQ zustande?

Die vorherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass es eine Art gegenseitige Regulation in der Expression bzw. der Degradation von den Proteinen STIM1 und Orai1 geben muss. Um die Ursache dieser Verschiebung der relativen Proteinmengen zu untersuchen, wurden deshalb verschiedene Arbeitshypothesen aufgestellt, die durch Experimente verifiziert oder falsifiziert werden sollten.

- A. Die STIM1DQ Mutante bewirkt (eventuell durch eine Verschiebung des ER Ca²⁺ Gehaltes) einen erhöhten so genannten ER Stress. Dies führt zur Aktivierung der unfolded protein response (UPR), welche zur Inhibition der Translation führen kann (Xu et al, 2005).
- B. Das Orai1 Protein wird durch verstärkte Aktivität von Ubiquitinilierungsenzymen vermehrt zum Abbau markiert.
- C. Die Degradation von Orai1 beruht auf einer erhöhten Aktivität spezifischer Proteinasen (z.B. Caspasen) welche das Orai1 Protein an definierten Schnittstellen schneiden.

Arbeitshypothese A: ER-Stress und UPR

Um diese Möglichkeiten gegeneinander abzuwägen, wurde zunächst untersucht, ob STIM1DQ exprimierende Zellen unter ER- Stress leiden.

Tunicamycin behandelte Jurkat T Zellen dienten in einem ersten Versuchsansatz als Positivkontrolle, da bekannt ist, dass Tunicamycin unter anderem ER-Stress auslösen kann (Suyama et al, 2011) und auch in diesen Zellen eine erhöhte Stromdichte von I_{CRAC} nachgewiesen werden konnte. Deshalb wurde die RNA von unbehandelten, DMSO behandelten und Tunicamycin behandelten Jurkat T-Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und in eine quantitative Real time PCR eingesetzt. Hierbei diente die Expression des Chaperons Grp78 als Indikator für ER Stress, da bekannt ist, dass Grp78 in Zellen mit ER-Stress hochreguliert wird um der UPR entgegen zu wirken (Badiola et al, 2011). Zudem wurde die mRNA Menge von STIM1 und Orai1 quantifiziert, um eine Aussage über das STIM1 zu Orai1 Verhältnis in diesen Zellen machen zu können.

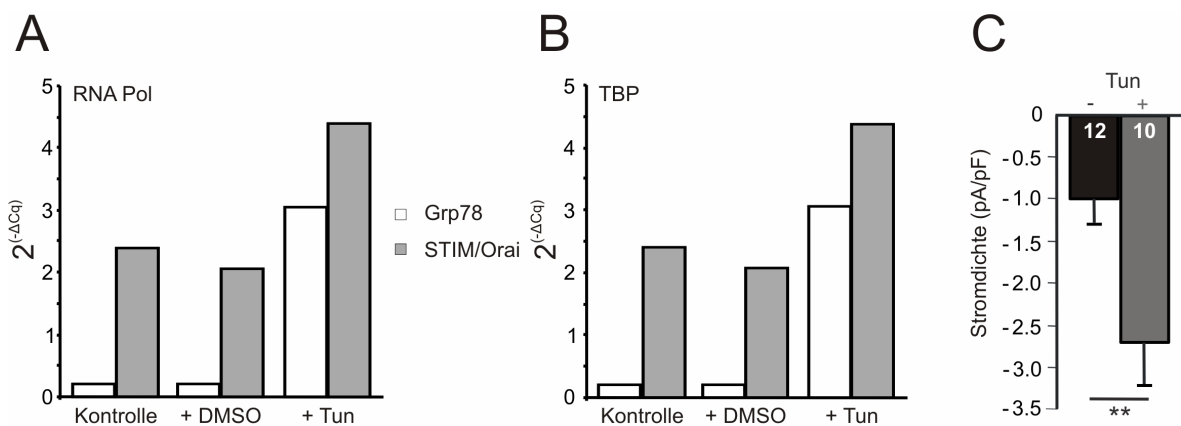


Abbildung 34: Tunicamycin induziert ER-Stress in Jurkat T Zellen und verändert damit das STIM1 zu Orai1 Verhältnis, sowie die Stromdichte von I_{CRAC} . **A** Jurkat T Zellen wurden über Nacht mit 3 μ g/ml Tunicamycin bzw. dessen Lösemittel DMSO inkubiert oder blieben unbehandelt und wurden am nächsten Tag zur RNA Isolation geerntet. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und anschließend als Template in eine quantitative Real time PCR eingesetzt. Bestimmt wurden die ΔCq Werte für die mRNA von STIM1, Orai1 und GRP78, normiert auf die Menge des Referenzgens RNA Polymerase. Dargestellt sind die $2^{-\Delta Cq}$ Werte von Grp78 (grau) und des STIM1 zu Orai1 Ratios (weiß). **B** Jurkat T Zellen wurden wie unter A behandelt und in eine quantitative Real time PCR eingesetzt. Bestimmt wurden die ΔCq Werte für die mRNA von STIM1, Orai1 und GRP78 normiert auf die Menge des Haushaltsgens TBP. Dargestellt sind die $2^{-\Delta Cq}$ Werte von Grp78 (grau) und des STIM1 zu Orai1 Ratios (weiß). **C** Jurkat T Zellen wurden über Nacht mit 3 μ g/ml Tunicamycin bzw. dessen Lösemittel DMSO inkubiert und in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Der Strom wurde durch 50 μ M IP_3 in der Pipette aktiviert und die externe Lösung enthielt 10 mM Ca^{2+} . Kontinuierliche Spannungsrampen von -100 mV bis +100 mV wurden angelegt, aufgetragen ist die Stromdichte bei -80 mV nach 110 s

Die $2^{-\Delta Cq}$ Werte der quantitativen Real Time PCR sind einmal nach Normalisierung auf die mRNA des Referenzgens RNA Polymerase (Abbildung 34A) und einmal auf TBP (Abbildung 34B) aufgetragen. Beide Auftragungen zeigen das gleiche Ergebnis. Nach Tunicamycin Behandlung wird das Chaperon Grp78 hochreguliert und auch das STIM1 zu Orai1 Ratio verändert. Das Verhältnis verändert sich hin zu größeren Werten, ähnlich wie die Proteinratios nach Transfektion mit der STIM1DQ Mutante. Die DMSO Behandlung alleine hat keinen Einfluss auf die Transkription von Grp78, STIM1 oder Orai1. Die Verschiebung des STIM1 zu Orai1 Verhältnisses ist also nicht nur auf Proteinebene, sondern in diesem Fall auch schon auf mRNA Ebene zu erkennen. In den Patch-clamp Experimenten, dargestellt in Abbildung 34C, führt Tunicamycin zu einer Erhöhung der

Stromdichte von -0,9 pA/pF auf -2,6 pA/pF, was auf das veränderte STIM1 zu Orai1 Verhältnis zurückzuführen sein könnte.

So konnte gezeigt werden, dass Tunicamycin behandelte Jurkat T Zellen vergrößerten I_{CRAC} , verändertes STIM1 zu Orai1 mRNA Ratio und ER- Stress haben. Nun sollte untersucht werden, ob der ER-Stress und das veränderte Verhältnis der mRNAs auch in STIM1DQ transfizierten Zellen zu sehen ist.

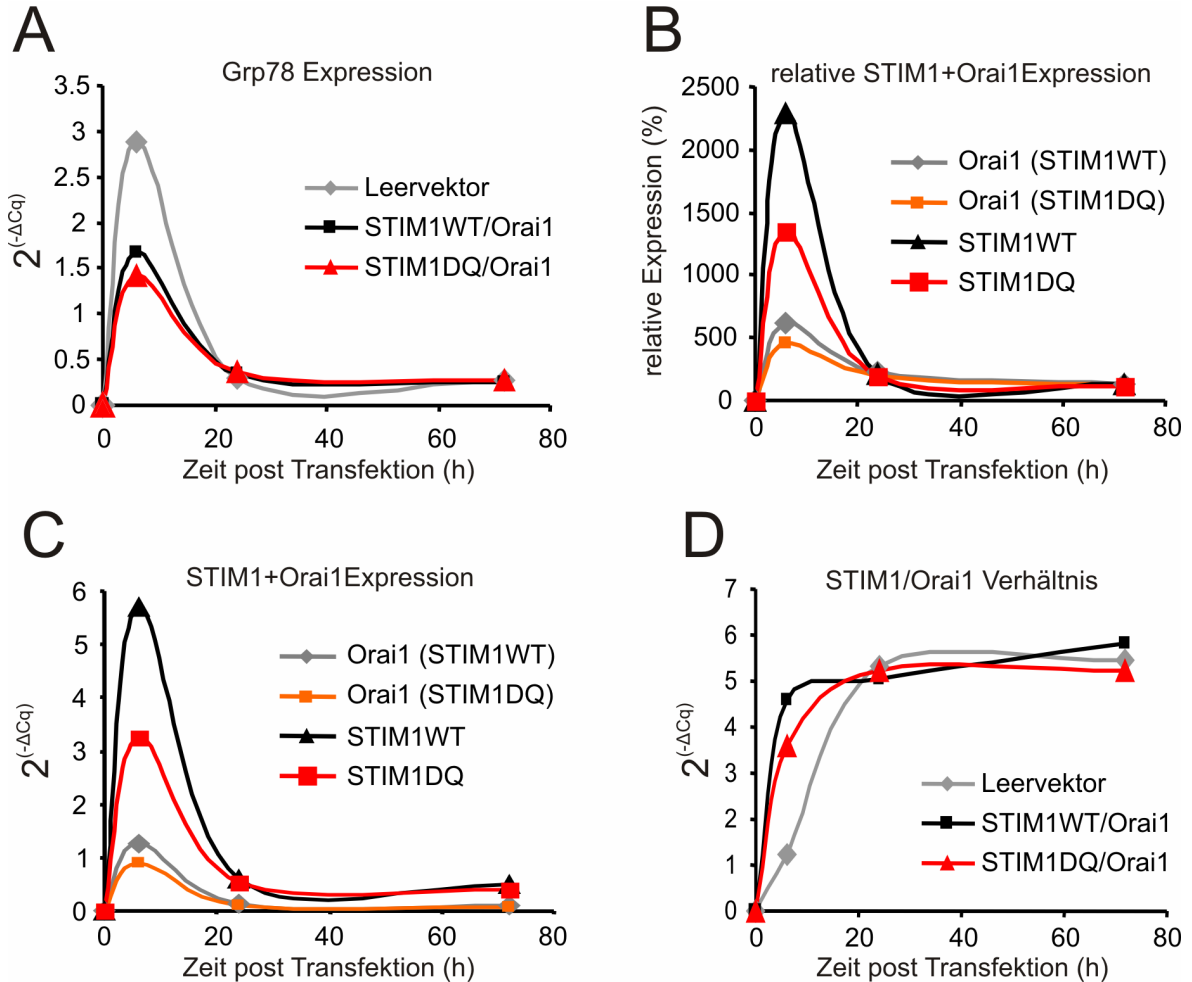


Abbildung 35: Die STIM1DQ Mutante induziert keinen ER-Stress. **A** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μ g Orai1 und 1,5 μ g STIM1WT bzw. STIM1DQ oder mit 0,5 μ g IRES_GFP und 1,5 μ g IRES_RFP Leervektoren transfiziert und am nächsten Tag zur RNA Isolation geerntet. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und anschließend als Template in eine quantitative Real time PCR eingesetzt. Bestimmt wurden die ΔCq Werte für die mRNA von STIM1, Orai1 und GRP78 normiert auf die Menge der Haushaltsgene RNA Polymerase und TBP. Dargestellt sind die $2^{(-\Delta Cq)}$ Werte von Grp78. **B-D** Die unter A beschriebenen Zellen wurde auch auf die Expressionslevel von STIM1 und Orai1 hin untersucht. In B ist die STIM1 und Orai1 Expression relativ zur Menge an STIM1 und Orai1 in den mit Leervektor transfizierten Zellen angegeben. Unter C finden sich die $2^{(-\Delta Cq)}$ Werte für die STIM1 und Orai1 Expression und unter D ist das Ratio der $2^{(-\Delta Cq)}$ Werte von STIM1 und Orai1 angegeben.

Die qRT-PCR in Abbildung 35A zeigt, dass die STIM1DQ transfizierten Zellen unter keinem erhöhten ER-Stress leiden. Die mRNA für Grp78 ist zwar sechs Stunden nach der Transfektion der HEK 293 Zellen erhöht, allerdings ist die Erhöhung des mRNA Levels in STIM1WT und STIM1DQ transfizierten Zellen gleich und bewegt sich um den $2^{(-\Delta Cq)}$ Wert eins. In den Zellen die mit Leervektor transfiziert wurden ist dieser Wert auf etwa drei erhöht. Bereits 24 h nach Transfektion fällt der $2^{(-\Delta Cq)}$ Wert in allen Zellen auf einen Wert kleiner 0,5.

Die Überexpression des STIM1 und Orai1 Proteins wird in der Abbildung 35B deutlich. Hier wurden die STIM1 und die Orai1 Expression relativ zur STIM1 und Orai1 Menge in den mit Leervektor transfizierten Zellen bestimmt. Die relative Expression von STIM1WT liegt bei 2290 % und die von STIM1DQ bei 1346 %. Die relative Menge von Orai1 in den entsprechend transfizierten Zellen beträgt 616 % und 462 %. Der mRNA Level entspricht auch sehr genau dem Transfektionsverhältnis. Nachdem dreimal mehr STIM1 DNA wie Orai1 DNA transfiziert wurden, liegt das Verhältnis für die STIM1WT transfizierten Zellen bei 1:3,7 und für die STIM1DQ transfizierten Zellen bei 1:2,9.

Zudem konnte gezeigt werden, dass das STIM1 zu Orai1 Verhältnis auf mRNA Ebene in den STIM1DQ transfizierten Zellen noch nicht erhöht ist (siehe Abbildung 35D). Das STIM1 zu Orai1 Verhältnis in STIM1DQ transfizierten Zellen auf mRNA Ebene ist weder sechs, noch 24 oder 72 Stunden nach Transfektion verschieden von dem Verhältnis der Zellen, die mit STIM1WT transfiziert wurden. Der Prozess der dazu führt, dass die Orai1 Proteinmenge nach Kotransfektion mit STIM1DQ erniedrigt ist, muss demnach nach der Transkription stattfinden.

Parallel zu der quantitativen PCR wurden Versuche mit silencing (si) RNA gegen PERK1 und IRE1, welche die UPR und damit den ER-Stress vermeiden sollten, durchgeführt. Im Falle von PERK1 und IRE1 handelt es sich um zwei Mitglieder verschiedener Proteinkinase Familien, die beide bei der Induktion der ER-Stressantwort eine essentielle Rolle spielen (Xu et al, 2005). Sie führen zum einen zu einem Translationsstopp, können aber auch die Proteindegradation initiieren bzw. verstärken. Zudem werden verschiedene Chaperone hochreguliert. All diese Mechanismen sollen die Proteinlast im ER, welche zum ER-Stress führt, reduzieren bzw. aufheben.

HEK293Zellen wurden simultan mit experimentell verifizierter siRNA gegen IRE1 und PERK1 und mit DNA für Orai1 und STIM1 transfiziert und 24 h und 48 h nach der Transfektion in whole cell Patch-clamp Experimenten analysiert. Zudem wurden die Proteinlysate auf das Proteinverhältnis von STIM1 zu Orai1 hin untersucht. Die Kontrollzellen wurden mit der entsprechenden Menge von non-silencing (ns) RNA transfiziert

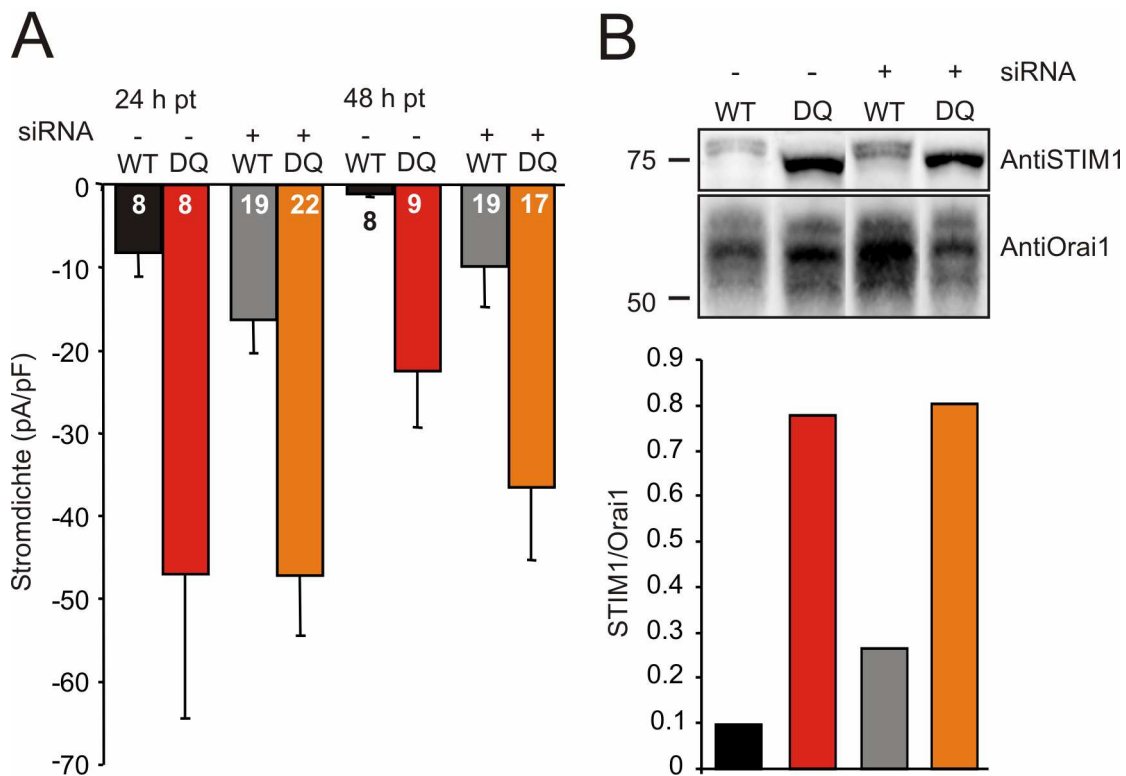


Abbildung 36: siRNA gegen PERK1 und IRE1 verändert I_{CRAC} und das STIM1WT zu Orai1 Proteinverhältnis. **A** HEK293 Zellen wurden mit insgesamt 4 μ l siRNA gegen PERK1 und IRE1 bzw. 4 μ l nsRNA und 0,5 μ g Orai1 und 1,5 μ g STIM1WT bzw. Stim1DQ transfiziert und anschließend in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Die Experimente wurden 24 h und 48 h nach der Transfektion (pt = post transfection) durchgeführt. Die externe Badlösung enthielt 2 mM Ca^{2+} und die Ströme wurden durch 50 μ M IP_3 in der Pipette aktiviert. Kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt. Dargestellt ist die Stromdichte bei -130 mV nach 110 s, normiert auf die Zellgröße. **B** HEK293 Zellen wurden wie unter A beschrieben transfiziert und die Proteinlysate 48 h nach Transfektion im Western Blot untersucht. Der Proteinblot wurde mit Antikörpern gegen STIM1 und Orai1 untersucht. Zudem ist die entsprechende Quantifizierung der Signale als STIM1 zu Orai1 Proteinratio angegeben.

Die Stromdichten in den STIM1DQ transfizierten Zellen 24 und 48 Stunden nach Behandlung mit nsRNA und siRNA sind signifikant erhöht gegenüber den Stromdichten in den Zellen mit STIM1WT (siehe Abbildung 36). Die STIM1DQ Mutante induziert 24 h nach der Transfektion Ströme der Größe -47,01 pA/pF zusammen mit der siRNA und -46,86 pA/pF zusammen mit der nsRNA. Nach 48 h ist die Stromgröße des STIM1DQ induzierten Stroms stark reduziert und beträgt in Gegenwart der nsRNA noch -22,41 pA/pF und in Gegenwart der siRNA -36,48 pA/pF. Auf den STIM1DQ induzierten Strom haben die siRNAs gegen IRE1 und PERK1 kaum Einfluss, wohingegen der STIM1WT induzierte Strom nach Transfektion der siRNA etwas größer ist. Diesen Effekt sieht man 48 h nach der Transfektion noch deutlicher. 24 h nach der Transfektion vergrößert die siRNA den Strom von -8,15 pA/pF auf -16,19 pA/pF. 48 h nach der Transfektion steigt die Stromdichte von -0,94 pA/pF auf -9,78 pA/pF. Insgesamt sind die Stromdichten 48 h nach der Transfektion deutlich reduziert gegenüber denen 24 h nach der Transfektion. Diese Ergebnisse lassen sich durch die Quantifizierung der Proteinblots in Abbildung 36B teilweise erklären. Auf das STIM1DQ zu Orai1 Ratio hat die siRNA keinen Einfluss, wohl aber auf das STIM1WT zu Orai1 Verhältnis. Dieses wird nach siRNA Transfektion zu einem höheren Wert hin verschoben. Insgesamt ist die Bande des STIM1DQ Proteins unter beiden Bedingungen stärker, als die STIM1WT Bande. In allen durchgeführten Western Blot Analysen konnte man immer wieder Schwankungen

in diesen Ergebnissen feststellen. In einigen wenigen Fällen war die STIM1WT Bande stärker als die STIM1DQ Bande oder es war umgekehrt. In den meisten Proteinblots allerdings waren die Banden für das STIM1WT und das STIM1DQ Protein etwa gleich stark. Allerdings wurde in fast allen Experimenten das STIM1 zu Orai1 Ratio untersucht und nicht die absolute Proteinmenge verglichen.

Da in diesem Versuchsansatz die DNA und die RNA simultan transfiziert wurden, war nicht klar, ob die siRNA in der Lage wäre den ER-Stress, welcher durch verstärkte Expression von STIM1DQ Protein induziert würde, zu verhindern. So wurde eine zweite Experimentreihe gestartet in der die Zellen zunächst mit siRNA gegen IRE1 und PERK1 bzw. nsRNA und 48 h später erst mit der DNA für STIM1 und Orai1 transfiziert wurden.

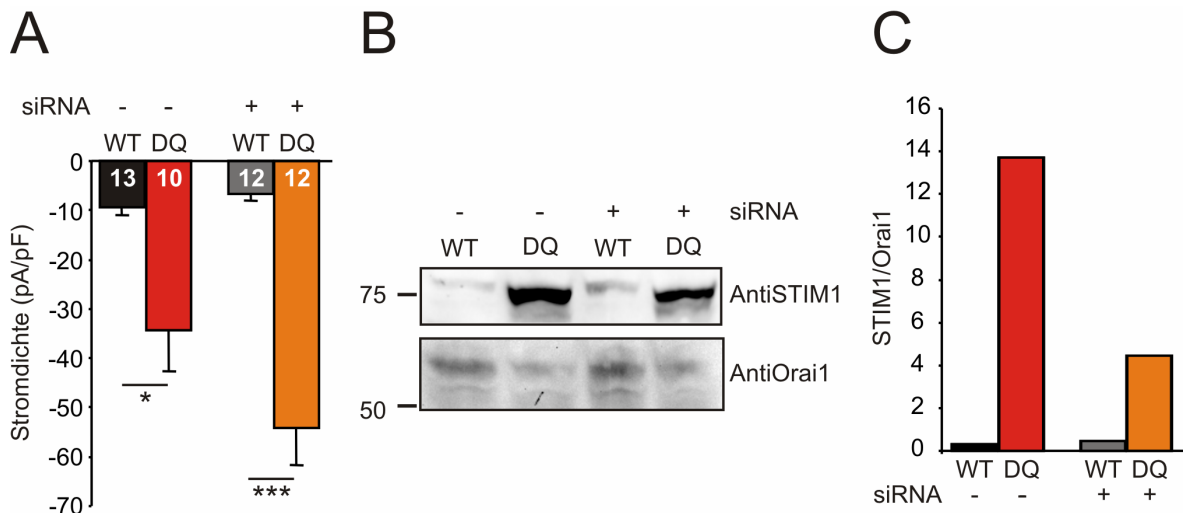


Abbildung 37: siRNA gegen PERK1 und IRE1 verändert I_{CRAC} und das STIM1DQ zu Orai1 Proteinverhältnis. **A** HEK293 Zellen wurden mit insgesamt 4 μ l siRNA gegen PERK1 und IRE1 bzw. 4 μ l nsRNA und 48 h später mit 0,5 μ g Orai1 und 1,5 μ g STIM1WT bzw. STIM1DQ transfiziert und anschließend in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Die Experimente wurden 24 h nach der DNA-Transfektion durchgeführt. Die externe Badlösung enthielt 2 mM Ca^{2+} und die Ströme wurden durch 50 μ M IP_3 in der Pipette aktiviert. Kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt. Dargestellt ist die Stromdichte bei -130 mV nach 110 s, normiert auf die Zellgröße. **B** HEK293 Zellen wurden wie unter A beschrieben transfiziert und die Proteinlysate 24 h nach DNA-Transfektion im Western Blot untersucht. Der Proteinblot wurde mit Antikörpern gegen STIM1 und Orai1 untersucht. **C** Quantifizierung der Signale aus dem Western Blot in B als STIM1 zu Orai1 Proteinratio.

Nach Transfektion der nsRNA ist die Stromdichte des STIM1DQ induzierten CRAC Stroms immer noch signifikant größer, als die des STIM1WT induzierten Stroms (siehe Abbildung 37A). Allerdings sind die Ströme in diesen Zellen kleiner als in Zellen, die nicht zusätzlich mit RNA transfiziert wurden (siehe oben). Nach Transfektion der siRNA bleibt die Stromdichte in Zellen mit STIM1WT annähernd gleich, während die Stromdichte in Zellen mit STIM1DQ zwar etwas verstärkt aber nicht signifikant vergrößert ist. Die siRNA bewirkt eine Reduktion des STIM1WT induzierten Stroms von -9,31 pA/pF auf -6,61 pA/pF während der STIM1DQ induzierte Strom von -34,38 pA/pF auf -54,15 pA/pF ansteigt. Die Auswertung der Proteinblots in Abbildung 37B+C zeigt, dass sich das STIM1WT zu Orai1 Verhältnis nicht ändert, das Verhältnis von STIM1DQ zu Orai1 nach siRNA Behandlung allerdings deutlich kleiner wird. Dieses Ergebnis widerspricht der Theorie, dass ein höheres STIM1:Orai1 Proteinratio den Strom vergrößert. Beide Experimente mit der siRNA gegen PERK1 und IRE1 zeigen sehr unterschiedliche Ergebnisse auf. Bei der simultanen Transfektion von siRNA und DNA verändern sich das Proteinverhältnis und die Ströme mit

STIM1WT. Nach zweifacher Transfektion, zuerst mit siRNA und danach mit DNA hingegen, werden die Proteinverhältnisse und die Stromdichten in den Zellen mit STIM1DQ beeinflusst. Sowohl die qRT-PCR als auch die siRNA Versuche sprechen gegen die Theorie, dass durch STIM1DQ induzierter ER-Stress die Ursache für die Reduktion der Orai1 Proteinmenge nach Kotransfektion mit STIM1DQ sein könnte.

Arbeitshypothese B: Ubiquitinilierungsenzyme

Eine weitere Möglichkeit Proteinmengen zu modifizieren, ist die verstärkte Aktivität des Proteasoms, welches mit Ubiquitin markierte Proteine abbaut (Park & Kim, 2012). Um den Einfluss dieses Proteinabbauweges auf das veränderte STIM1 zu Orai1 Proteinratio zu untersuchen wurden HEK293 Zellen mit STIM1DQ bzw. STIM1WT und Orai1 transfiziert und über verschiedene Zeitspannen mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt.

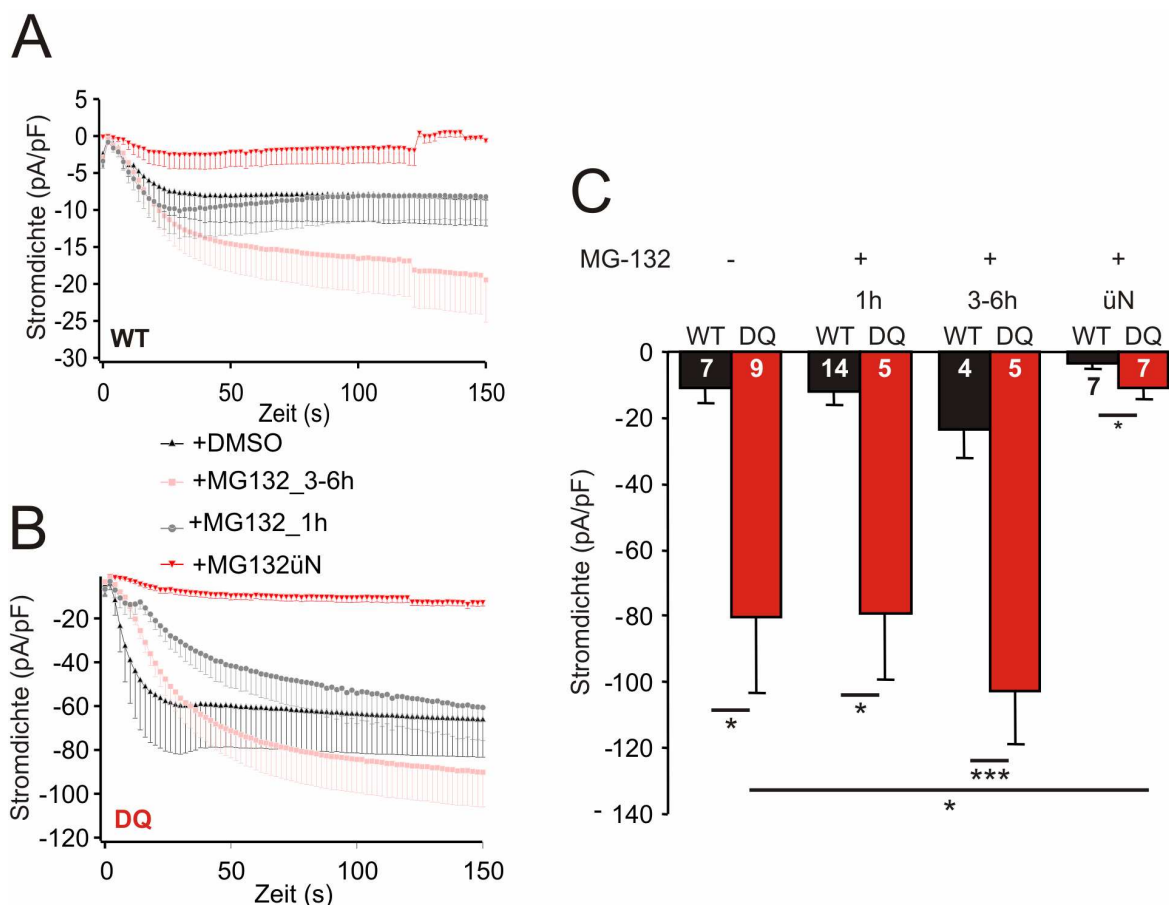


Abbildung 38: MG132 verändert die Stromdichte von I_{CRAC} . A+B HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μ g Orai1 und 1,5 μ g STIM1WT (A) bzw. STIM1DQ (B) transfiziert und über verschiedenen Zeitspannen (eine Stunde, drei bis sechs Stunden, üN) mit dem Proteasominhibitor MG132 bzw. dessen Lösemittel DMSO inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt und die Ströme wurden durch 50 μ M IP_3 in der Pipette aktiviert. Dargestellt ist die Entwicklung der Stromdichte bei -130 mV, normiert auf die Zellgröße, über die Zeit. C Auftragung der Stromdichte der Zellen aus A und B. Die Stromdichte wurde nach 110s bei -130 mV Spannung extrahiert.

In allen untersuchten Bedingungen sind die STIM1DQ vermittelten Ströme immer größer, als die STIM1WT vermittelten. Eine einstündige Inkubation von STIM1 und Orai1 transfizierten Zellen mit dem Proteasominhibitor MG132 hat keinen Einfluss auf die finale Stromdichte von I_{CRAC} . STIM1WT transfizierte Zellen generieren CRAC mit einer Stromdichte von -11,18 pA/pF ohne

MG132 und mit einer Stromdichte von -12,23 pA/pF nach einer Stunde Inkubation mit MG132. Der STIM1DQ induzierte Strom beträgt -80,52 pA/pF ohne MG132 und -79,42 pA/pF nach der einstündigen Inkubation mit MG132. Allerdings verändert sich der zeitliche Verlauf der Stromentwicklung in STIM1DQ transfizierten Zellen. Die Stromentwicklung in Abbildung 38B ist durch eine kurze Phase der Inhibition unterbrochen, was den zeitlichen Verlauf der Stromentwicklung deutlich verändert. Das gleiche Phänomen tritt nach drei bis sechs Stunden Inkubation mit MG132 auf. Allerdings ist hier die finale Stromdichte in Zellen mit STIM1DQ und STIM1WT etwas erhöht. Nach drei bis sechs Stunden in der Gegenwart von MG132 beträgt die Stromdichte in den Zellen mit STIM1WT -23,64 pA/pF und in den Zellen mit STIM1DQ -102,58 pA/pF. Überraschenderweise führt die Inhibition des Proteasoms über Nacht im Fall von STIM1WT und STIM1DQ zu einer fast vollständigen Inhibition von I_{CRAC} . Die Stromdichte der Zellen transfiziert mit STIM1WT beträgt noch -3,4 pA/pF und die der Zellen mit STIM1DQ noch -7,42 pA/pF. Die Proteinblots zu diesem Versuch scheiterten in mehreren Anläufen, so dass das STIM1:Orai1 Proteinverhältnis leider nicht bestimmt werden konnte. Die Tatsache aber, dass nach Inkubation der Zellen über Nacht mit MG132 kaum Strom mehr zu sehen ist, weist darauf hin, dass MG132 komplexe und weitgefächerte Auswirkungen auf die Physiologie der Zellen hat und sich wahrscheinlich als weniger gutes Werkzeug zur Untersuchung dieser Fragestellung eignet.

Arbeitshypothese C: Verstärkte Caspaseaktivität durch eine erhöhte basale Ca^{2+} Konzentration

Es sollte untersucht werden, ob die Reduktion der Orai1 Proteinmenge durch die verstärkte Aktivität von Caspasen zustande kommt. Caspasen sind Proteasen, welche Peptidbindungen spalten und zu den wichtigsten Werkzeugen der Apoptose gezählt werden. Diese Enzyme zeigen eine Ca^{2+} -abhängige Aktivität, weshalb zunächst die Ca^{2+} -Abhängigkeit des STIM1DQ Effektes bestimmt werden sollte.

Zunächst wurden Zellen mit der nicht funktionellen Orai1R91W Mutante, der so genannten SCID Mutante, transfiziert. SCID steht für severe combined immunodeficiency und beschreibt ein Immundefizienzsyndrom. Eine einzelne Punktmutation im Orai-Gen (R91W) führt zu einem Funktionsverlust des Proteins, verbunden mit einem Verlust des speichergesteuerten Calciumeinstroms in den T-Zellen dieser Patienten. Dies führt zu Defekten in der Immunantwort (Feske et al, 2006). Die Proteinlysate der so transfizierten Zellen wurden untersucht und zudem wurde auch die basale Calciumionenkonzentration in den Zellen bestimmt.

Transfiziert man die STIM1DQ Mutante zusammen mit der nicht funktionellen Orai1R91W SCID Mutante, so wird das Orai1 Protein nicht herunter reguliert und das STIM1 zu Orai1 Verhältnis in Zellen mit STIM1WT bzw. STIM1DQ ist annähernd gleich (siehe Abbildung 39A+B). In Fura 2AM basierenden Calciumionenkonzentrationsbestimmungen wurde bereits zuvor gezeigt, dass die STIM1DQ Mutante ein erhöhtes Basalcalcium induziert (siehe Abbildung 16B, Seite 78). Bei einer externen Calciumionenkonzentration von 0,25 mM Ca^{2+} beträgt die basale Calciumkonzentration innerhalb der Zellen 33,96 nM für STIM1DQ, lediglich 13,78 nM im Falle von STIM1WT. Nach Kotransfektion mit der nicht funktionellen Orai1R91W Mutante ist die basale Calciumionenkonzentration in den STIM1DQ exprimierenden Zellen gleich derer in Zellen die mit STIM1WT und Orai1WT transfiziert wurden und beträgt 14,07 nM. In 2 mM Ca^{2+} externer Lösung beträgt der basale Wert für STIM1WT 22,01 nM und für STIM1DQ 115,09 nM. Transfiziert man die STIM1DQ Mutante zusammen mit Orai1R91W, so beträgt die basale Ca^{2+} Konzentration in 2 mM

Ca^{2+} externer Lösung nur noch 26,57 nM. Dies weist darauf hin, dass ein Calciumeinstrom durch den Orai1 Kanal für den erhöhten basalen Calciumwert verantwortlich ist. Und sehr wahrscheinlich führt diese erhöhte basale Calciumionenkonzentration in den mit STIM1DQ transfizierten Zellen auch zu einem Ca^{2+} -abhängigen Prozess, welcher die Orai1 Proteinmenge reduziert.

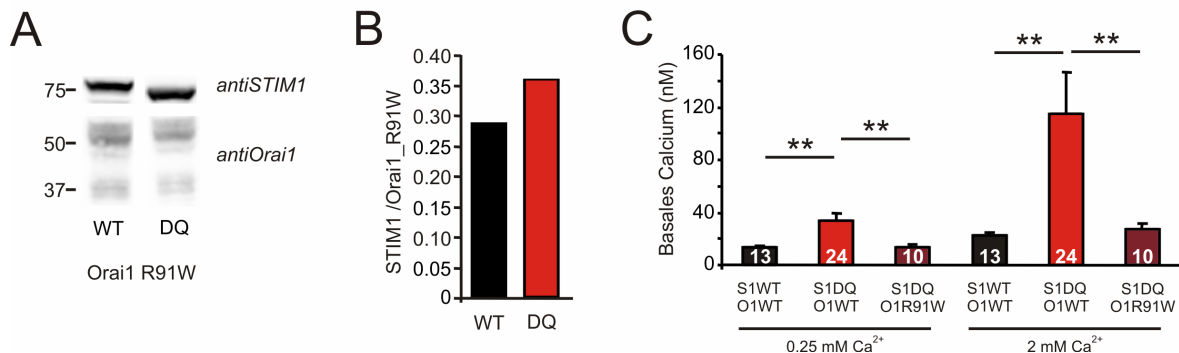


Abbildung 39: Die Reduktion der Orai1 Proteinmenge nach Kotsinfektion mit STIM1DQ ist ein Ca^{2+} -abhängiger Prozess. **A** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μg Orai1R91W und 1,5 μg STIM1WT bzw. STIM1DQ transfiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Transfektion auf Proteinebene untersucht. Dargestellt ist der Originalblot inkubiert mit Antikörpern gegen STIM1 und Orai1. **B** Quantitative Auswertung des Proteinblots aus A. Dargestellt ist das STIM1 zu Orai1 Verhältnis der Proteinmenge in den Proteinlysaten. **C** HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μg Orai1R91W bzw. Orai1WT und 1,5 μg STIM1WT bzw. STIM1DQ transfiziert und in Fura 2AM basierenden Calciumionenkonzentrationsmessungen untersucht. Die externe Calciumionenkonzentration betrug 0,25 oder 2 mM Ca^{2+} . Statistisch ausgewertet und dargestellt ist die basale Calciumionenkonzentration.

Um zu testen, ob die Caspaseaktivität I_{CRAC} bzw. das STIM1 zu Orai1 Proteinverhältnis verändern kann, wurden HEK293 Zellen mit STIM1DQ bzw. STIM1WT und Orai1 transfiziert und über Nacht mit dem Caspase-3 Inhibitor V behandelt. Anschließend wurden die Zellen in Patch-clamp Messungen und die Lysate mit Western Blot untersucht.

Die Behandlung der transfizierten Zellen mit dem Caspaseinhibitor reduziert die Stromdichte von I_{CRAC} , sowohl in den STIM1WT als auch in den STIM1DQ transfizierten Zellen (siehe Abbildung 40A). Der STIM1WT induzierte Strom sinkt von -11,56 pA/pF auf -5,49 pA/pF. Im Fall von STIM1DQ verringert sich die Stromdichte von -71,87 pA/pF auf -45,61 pA/pF. Zudem zeigt der Originalblot in Abbildung 40B, dass die Orai1 Bande nach Inkubation mit dem Caspaseinhibitor deutlich verstärkt ist. Dies führt zu einer Verringerung des STIM1 zu Orai1 Protein Verhältnisses für STIM1WT und für STIM1DQ, gezeigt in Abbildung 40C. Dies bedeutet, dass mit dem Caspaseinhibitor sowohl die Stromdichte von I_{CRAC} als auch der Abbau von Orai1 reduziert werden kann und somit ein Caspase-abhängiger Prozess für die Verringerung der Orai1 Proteinmenge verantwortlich sein könnte. Diese Hypothese muss allerdings in Zukunft noch näher untersucht und bestätigt werden.

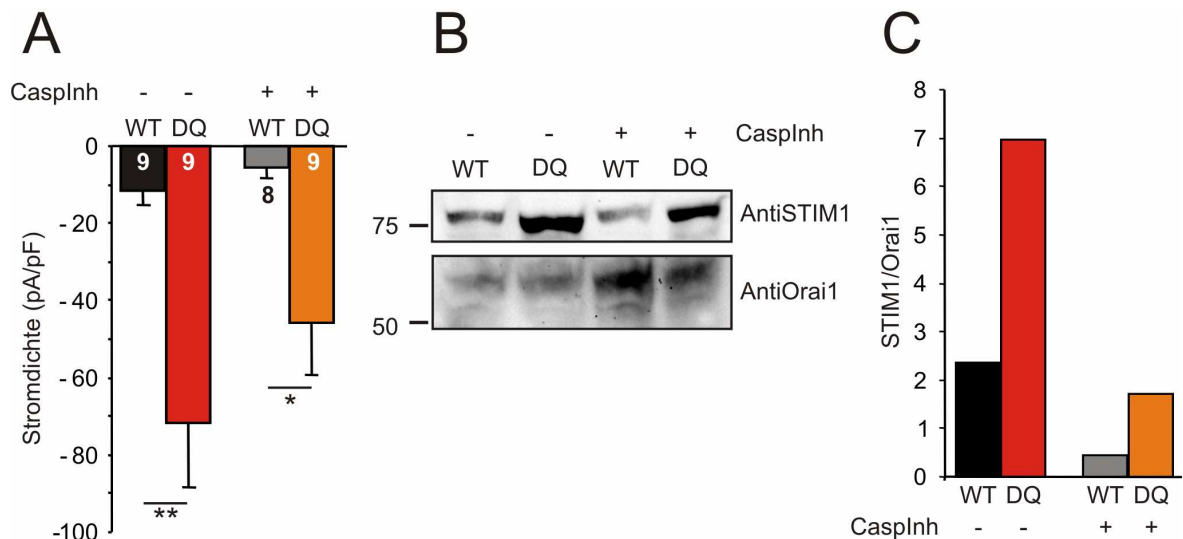


Abbildung 40: Caspaseinhibitor reduziert die STIM1DQ induzierte Stromdichte von I_{CRAC} und das STIM1DQ zu Orai1 Proteinratio. A HEK293 Zellen wurden mit 0,5 μ g Orai1 und 1,5 μ g STIM1WT bzw. STIM1DQ transfiziert, über Nacht mit 20 μ M des Caspase-3 Inhibitors V oder seinem Lösemittel DMSO inkubiert und anschließend in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Die externe Badlösung enthielt 2 mM Ca^{2+} . Kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt und die Ströme wurden durch 50 μ M IP_3 in der Pipette aktiviert. Dargestellt ist die Stromdichte bei -130 mV nach 110 s, normiert auf die Zellgröße. B HEK293 Zellen wurden wie unter A beschrieben transfiziert und die Proteinlysate 24 h nach Transfektion im Western Blot untersucht. Der Proteinblot wurde mit Antikörpern gegen STIM1 und Orai1 untersucht. C Quantifizierung der Signale aus dem Western Blot in B als STIM1 zu Orai1 Proteinratio.

6.14 Die Orai1 N223A glykosylierungsdefiziente Mutante vermittelt Wildtyp-ähnliche Calciumsignale in HEK293 Zellen

Nachdem die glykosylierungsdefizienten Mutanten von STIM1 genau untersucht wurden, sollten nun Untersuchungen mit einer glykosylierungsdefizienten Mutante des Orai1 Proteins durchgeführt werden. Hierzu wurde das Asparagin an Position N223, welches die einzige Glykosylierungsstelle im Orai1 Protein trägt, zunächst in ein Glutamin mutiert und im so genannten Überexpressionssystem untersucht. Die Orai1N223Q Mutante ist allerdings nicht funktionell. In Patch-clamp Experimenten kann kein I_{CRAC} nachgewiesen werden. Deshalb wurde das Asparagin an Position 223 in ein Alanin mutiert. Die Orai1N223A Mutante ist funktionell und zeigt nach Ko-Überexpression mit einem STIM1WT Konstrukt ähnliches Verhalten wie das Orai1 Wildtyp Protein.

Sowohl die Stromentwicklung in den Patch-clamp Versuchen, als auch die Strom-Spannungskurven von Orai1WT- und Orai1N223A- vermittelten Calciumströmen sind nahezu identisch. Die Stromdichte für das WT- Konstrukt ist mit -64,27 pA/pF kaum verschieden von dem glykosylierungsdefizienten N223A Konstrukt, welches eine Stromdichte von -65,67 pA/pF vermittelt. Auch in Fura 2AM basierenden Calciumkonzentrationsbestimmungen wurden keine Unterschiede aufgedeckt (siehe Abbildung 41D).

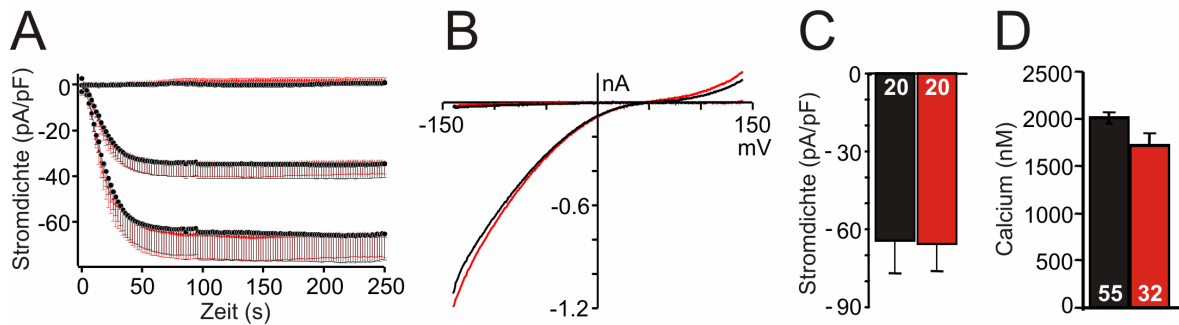


Abbildung 41: Die Orai1 N223A Mutante kann nicht glykosyliert werden, vermittelt dennoch WT-ähnliche Calciumsignale. A-C Stabile HEKSTIM1 Zellen wurden mit Orai1WT- (schwarz) bzw. Orai1N223A- (rot) DNA transfiziert und in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt. Insgesamt wurden 20 Zellen pro Konstrukt aus verschiedenen Transfektionen untersucht. I_{CRAC} wurde durch 50 μ M IP_3 in der Pipette aktiviert und die externe Lösung enthielt 10 mM Ca^{2+} . Dargestellt ist die Entwicklung des Stroms, normiert auf die Zellgröße, gegen die Zeit (A), die Strom- Spannungscurven (B), sowie die Stromdichte bei -130 mV nach 110 s. D Die unter A-C beschriebenen Zellen wurden auch in Fura 2AM basierenden Calciumionenkonzentrationsmessungen mit dem Ca^{2+} - Readdition Protokoll untersucht. Die Zellen befanden sich zu Beginn der Messung für 100 s in einer 0,5 mM Ca^{2+} -Lösung. Anschließend wurden die Zellen mit einer Ca^{2+} -freien Lösung perfundiert und weitere 300 s gemessen. Die Speicher wurden durch Zugabe von 1 μ M Thapsigargin in Ca^{2+} -freier Lösung entleert (1000 s) und dann wurde der Calciumeinstrom über Kanäle in der Plasmamembran nach Perfusion mit 0,5 mM Ca^{2+} -haltiger Lösung bestimmt (600 s). Statistisch ausgewertet und dargestellt ist die maximale Calciumionenkonzentration nach Calciumeinstrom.

Das Orai1N223A Konstrukt wurde in verschiedenen Zellsystemen (stabile HEKSTIM1 Zellen, HEK293 Zellen, stabile HEKOrai1N223A- Zellen) unter verschiedenen Bedingungen untersucht und es konnten keine Unterschiede zu den Orai1WT vermittelten Calciumsignalen gefunden werden.

6.15 Die Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1 (ST6-Gal1) beeinflusst die Funktionalität von STIM1 und Orai1 nicht

Gwack et al. zeigten 2007, dass die Orai1N223A Mutante einen erhöhten Calciumeinstrom in Fibroblasten aus SCID Patienten hervorrufen kann (Gwack et al, 2007b). Dies deckt sich allerdings nicht mit den Ergebnissen in den HEK293 Zellen. Es ist allerdings möglich, dass die HEK293 Zellen ein anderes Set an zuckermodifizierenden Enzymen besitzen wie die Fibroblasten und dadurch die Unterschiede erklärt werden können. Deshalb wurden HEK293 Zellen in einem weiteren Versuchsansatz zusätzlich mit der Sialyltransferase ST6-Gal1 transfiziert. Sialyltransferasen katalysieren die Übertragung von Sialinsäuren auf Zuckerketten in Proteinen und arbeiten demnach den Neuraminidasen entgegengesetzt. Es wurden zunächst stabile HEKSTIM1 Zellen mit den Konstrukten für Orai1 und ST6-Gal1 transfiziert und in Patch-clamp und Calciumimagingexperimenten untersucht.

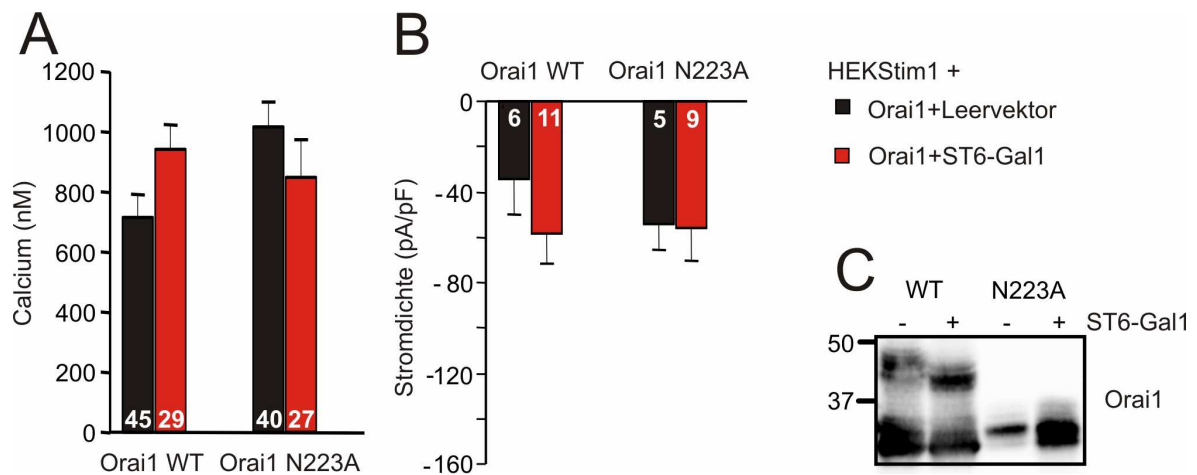


Abbildung 42: Die Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1 (ST6-Gal1) hat keinen Effekt auf SOCE und I_{CRAC} . **A** Stabile HEKSTIM1 Zellen wurden mit 0,5 μ g Orai1 und 0,5 μ g Leervektor bzw. 0,5 μ g Orai1 und 0,5 μ g ST6-Gal1 transfiziert. Alle Zellen wurden 24 h nach Transfektion in Fura 2AM basierenden Calciumimagingexperimenten mit dem Ca^{2+} - Readdition Protokoll untersucht. Die Zellen befanden sich zu Beginn der Messung für 100 s in einer 0,5 mM Ca^{2+} -Lösung. Anschließend wurden die Zellen mit einer Ca^{2+} -freien Lösung perfundiert und weitere 300 s gemessen. Die Speicher wurden durch Zugabe von 1 μ M Thapsigargin in Ca^{2+} -freier Lösung entleert (1000 s) und dann wurde der Calciumeinstrom über Kanäle in der Plasmamembran nach Perfusion mit 0,5 mM Ca^{2+} -haltiger Lösung bestimmt (600 s). Dargestellt ist der maximale Calciumeinstrom der verschiedenen Zellen im Vergleich. **B** Zellen wurden wie unter A beschrieben transfiziert und 24h nach Transfektion in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt und die externe Badlösung enthielt 10 mM Ca^{2+} . Die Ströme wurden durch 50 μ M IP_3 in der Pipette ausgelöst. Dargestellt ist die Stromdichte bei -130 mV nach 200 s im Vergleich. **C** Ein Teil der unter A und B verwendeten Zellen wurde lysiert und im Western Blot analysiert. Der Blot wurde mit einem Anti Orai1 Antikörper untersucht.

Die Kotretransfektion von Orai1WT und ST6-Gal1 führt zu keiner signifikanten Veränderung von SOCE und I_{CRAC} , wie in Abbildung 42A+B sichtbar. Die maximale Calciumionenkonzentration erhöht sich in den Zellen mit Orai1WT nach Kotretransfektion mit der ST6-Gal1 von 714 nM Ca^{2+} auf 1015 nM Ca^{2+} . Die Stromdichte erhöht sich nach Kotretransfektion von Orai1WT mit ST6-Gal1 von -34,01 pA/pF auf -58,48 pA/pF. In den Zellen mit Orai1N223A bewirkt die ST6-Gal1 eine Reduktion der Calciumionenkonzentration von 939 nM auf 846 nM Ca^{2+} . Mit Orai1N223A liegt die Stromdichte bei -53,97 pA/pF. Die Kotretransfektion von Orai1N223A mit ST-6 Gal1 weist eine Stromdichte von -55,73 pA/pF auf. Der Western Blot in Abbildung 42C zeigt, dass die ST6-Gal1 Expression einen Shift in der Orai1WT glykosylierten Bande bei etwa 50 kDa bewirkt und die Orai1N223A transfizierten Zellen keine glykosylierte Bande aufweisen und somit kein ST6-Gal1 Effekt erkennbar ist.

In einem nächsten Versuchsansatz wurden Orai1 stabile Zelllinien für das Experiment verwendet. Zudem wurden Experimente mit einem STIM1-Orai1 Kombivektor gemacht. Wie bereits zuvor gezeigt, ist das Orai1 zu STIM1 Proteinverhältnis sehr wichtig für die Eigenschaften von I_{CRAC} . Da bei einer Kotretransfektion von STIM1 und Orai1 in verschiedenen Vektoren nie sichergestellt werden kann, wie viele Konstrukte eine Zelle aufgenommen hat, ist es schwierig gesehene Effekte mit der ST-6 Gal1 zu interpretieren. So wurden HEK293 Zellen mit dem Kombivektor und dem Konstrukt für ST-6 Gal1 kotretransfiziert und in Patch-clamp Experimenten untersucht. Bei dieser Vorgehensweise ist es gleich, wie viele Konstrukte die Zellen aufnehmen, das STIM1:Orai1 Proteinverhältnis wird immer gleich sein.

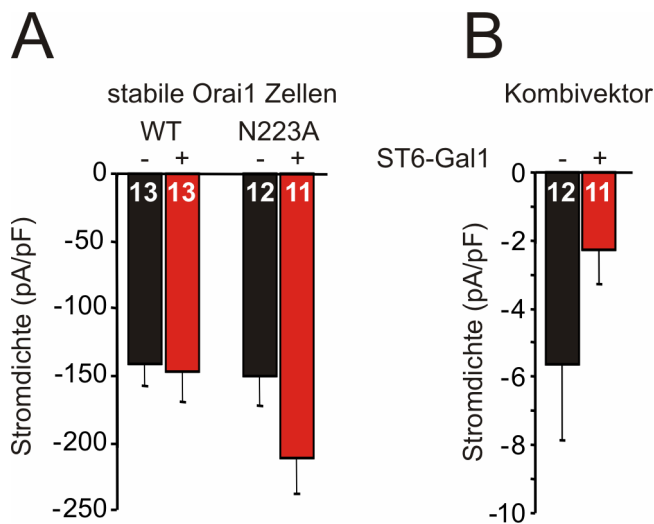


Abbildung 43: Die Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1 (ST6-Gal1) hat keinen Effekt auf I_{CRAC} . **A** Stabile HEKOrai1 Zellen wurden mit 1 μ g STIM1 und 0,5 μ g Leervektor bzw. 1 μ g STIM1 und 0,5 μ g ST6-Gal1 transfiziert und 24h nach Transfektion in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt und die externe Badlösung enthielt 10 mM Ca^{2+} . Der Strom wurde durch 50 μ M IP_3 in der Pipette aktiviert. Dargestellt ist die Stromdichte bei -130 mV nach 110 s im Vergleich. **B** HEK293 Zellen wurden mit 1 μ g eines STIM1-Orai1 Kombivektors und 0,5 μ g Leervektor bzw. 1 μ g eines STIM1-Orai1 Kombivektors und 0,5 μ g ST6-Gal1 transfiziert und 24 h nach Transfektion in whole cell Patch-clamp Experimenten untersucht. Kontinuierliche Spannungsrampen von -150 mV bis +150 mV wurden angelegt und die externe Badlösung enthielt 10 mM Ca^{2+} . Der Strom wurde durch 50 μ M IP_3 in der Pipette aktiviert. Dargestellt ist die Stromdichte bei -130 mV nach 110 s im Vergleich

Auch bei der Wiederholung des Experiments in Orai1 stabilen Zellen (siehe Abbildung 43A) ist keine Reduktion der Stromdichte bei Kotransfektion mit ST6-Gal1 zu sehen. Im Fall der Transfektion in die Orai1WT stabilen Zellen beträgt die Stromdichte ohne die ST-6 Gal1 -140,79 pA/pF und mit der ST-6 Gal1 -174,14 pA/pF. In den Orai1N223A stabilen Zellen liegt die Stromdichte bei -149,26 pA/pF und wird durch die Transfektion mit ST-6 Gal1 auf -210,17 pA/pF erhöht.

Da aus der Literatur (Scrimgeour et al, 2009) bekannt ist, dass das Proteinverhältnis von STIM1 zu Orai1 sehr wichtig für die Eigenschaften von I_{CRAC} ist, wurden HEK293 Zellen mit einem STIM1-Orai1 Kombivektor transfiziert. So konnte sichergestellt werden, dass das STIM1 zu Orai1 Verhältnis in allen untersuchten Zellen, unabhängig von der Transfektionseffizienz, immer gleich ist. Aber auch nach Kotransfektion der ST6-Gal1 mit dem Kombivektors ist die Stromdichte nicht signifikant reduziert (siehe Abbildung 43B). Die Stromdichte ohne ST6-Gal1 beträgt -5,62 pA/pF und mit ST6-Gal1 -2,28 pA/pF. Die Reduktion ist nicht signifikant.

Die Kotransfektion der ST6-Gal1 beeinflusst die Funktionalität von STIM1 und Orai1 in HEK293 Zellen also nicht.

6.16 Effekte von Neuraminidasen und Klotho auf SOCE in primären $CD4^+$ T Zellen

Die Glykosylierung von Proteinen kann deren Struktur und Funktion beeinflussen und wird durch die Anwesenheit zuckermodifizierender Enzyme in den jeweiligen Zellen bestimmt. Die Behandlung von Jurkat T-Zellen mit Tunicamycin erhöhte SOCE und I_{CRAC} in diesen Zellen. Tunicamycin inhibiert allerdings den gesamten Vorgang der N-Glykosylierung und hat zudem noch weitere zelluläre Effekte. Mit der in Abbildung 44 dargestellten RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die ST6-Gal1 stark in primären humanen $CD4^+$ T-Zellen exprimiert ist. Deshalb sollten nun die Zuckerket-

ten von Oberflächenproteinen in primären humanen CD4⁺ T-Zellen durch Neuraminidasen und Klotho modifiziert und der Effekt auf SOCE untersucht werden. Die Neuraminidasen wirken Enzymen wie der ST6-Gal1 entgegengesetzt und entfernen endständige Sialinsäuren.

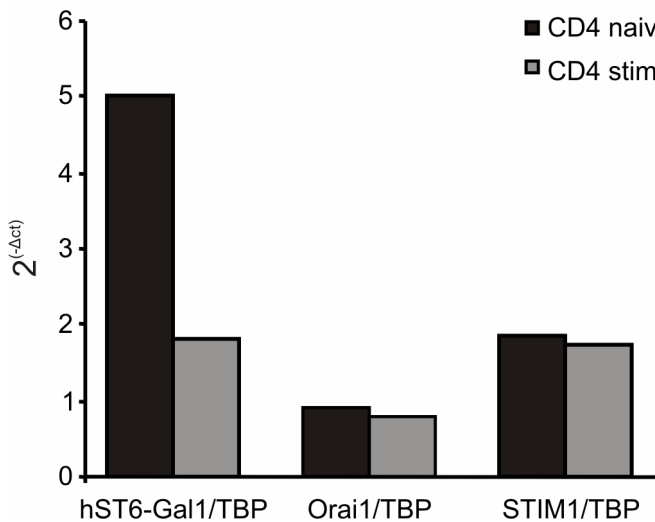


Abbildung 44: Quantitativer Nachweis der ST6-Gal1 Expression in primären humanen CD4⁺ T-Zellen. Aus naiven (schwarz) und mit CD3/CD28 stimulierten (grau) humanen CD4⁺ T-Zellen wurde RNA isoliert. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und anschließend als Template in eine quantitative Real time PCR eingesetzt. Bestimmt wurden die ΔC_q Werte für die mRNA von STIM1, Orai1 und ST6-Gal1, normiert auf die Menge des Referenzgens RNA Polymerase. Dargestellt sind die $2^{(-\Delta C_q)}$ Werte.

Für diese Experimente wurden primäre, humane CD4⁺ T Zellen (naiv oder mit CD3/CD28 stimuliert) über Nacht mit verschiedenen Neuraminidasen und mit Klotho behandelt und am nächsten Tag in Fura 2AM basierenden Ca²⁺- Fluoreszenzmessungen mit dem Ca²⁺-Readdition Protokoll untersucht. Mit diesem Protokoll werden die Entleerung der intrazellulären Speicher und der Calciumeinstrom über die PM separat betrachtet. Zunächst werden die intrazellulären Speicher durch Zugabe von Tg in einer Ca²⁺ freien Lösung entleert und nach Perfusion mit einer Ca²⁺ haltigen Lösung kann der Calciumeinstrom über die PM untersucht werden.

Neuraminidasen (Sialidasen) sind Enzyme, die Sialinsäuren von Amino- Glykoproteinen (N- glykosylierten Proteinen) abspalten und diese damit verdaubar machen. In der Natur kommen diese Enzyme in vielen Viren und Bakterien, aber auch in den Lysosomen von Mensch und Tier vor. Man unterscheidet Neuraminidasen mit unterschiedlicher Spezifität. In dieser Arbeit wurde zunächst die Neuraminidase aus *Clostridium perfringens* verwendet. Diese spaltet Sialinsäuren in α 2,3-, α 2,6- und α 2,8-Bindung.

Die Inkubation der CD4⁺ Effektor T Zellen und der CD4⁺ naiven T Zellen mit Neuraminidase (Sialidase) verändert die Calciumsignale dieser Zellen gegenüber den unbehandelten Zellen nicht (siehe Abbildung 45).

Weder die Calciumeinstromrate, noch der maximale Calciumeinstrom oder das Calciumplateau sind im Mittel signifikant verschieden, wenn man die mit Neuraminidase behandelten Zellen mit den Kontrollzellen vergleicht. Die Calciumeinstromrate in den behandelten Effektorzellen beträgt 22,34 nM Ca²⁺/s und in den Unbehandelten 29,25 nM Ca²⁺/s. In den naiven Zellen sind die Werte 13,58 nM Ca²⁺/s und 10,63 nM Ca Ca²⁺/s auch nicht signifikant verschieden. Der maximale Calciumeinstrom in den behandelten Effektorzellen beträgt 1847 nM Ca²⁺ und in den unbehandelten Zellen 1897 nM Ca²⁺. Die behandelten naiven Zellen erreichen einen maximalen Calciumeinstrom

von 1313 nM Ca^{2+} und die Unbehandelten von 1321 nM Ca^{2+} . Im Plateau erreichen die mit Neuraminidase behandelten Effektorzellen einen Wert von 1444 nM Ca^{2+} und die unbehandelten Zellen einen Wert von 1419 nM Ca^{2+} . Auch bei den naiven Zellen ist die Calciumionenkonzentration im Plateau mit Werten von 799 nM und 741 nM Ca^{2+} fast gleich.

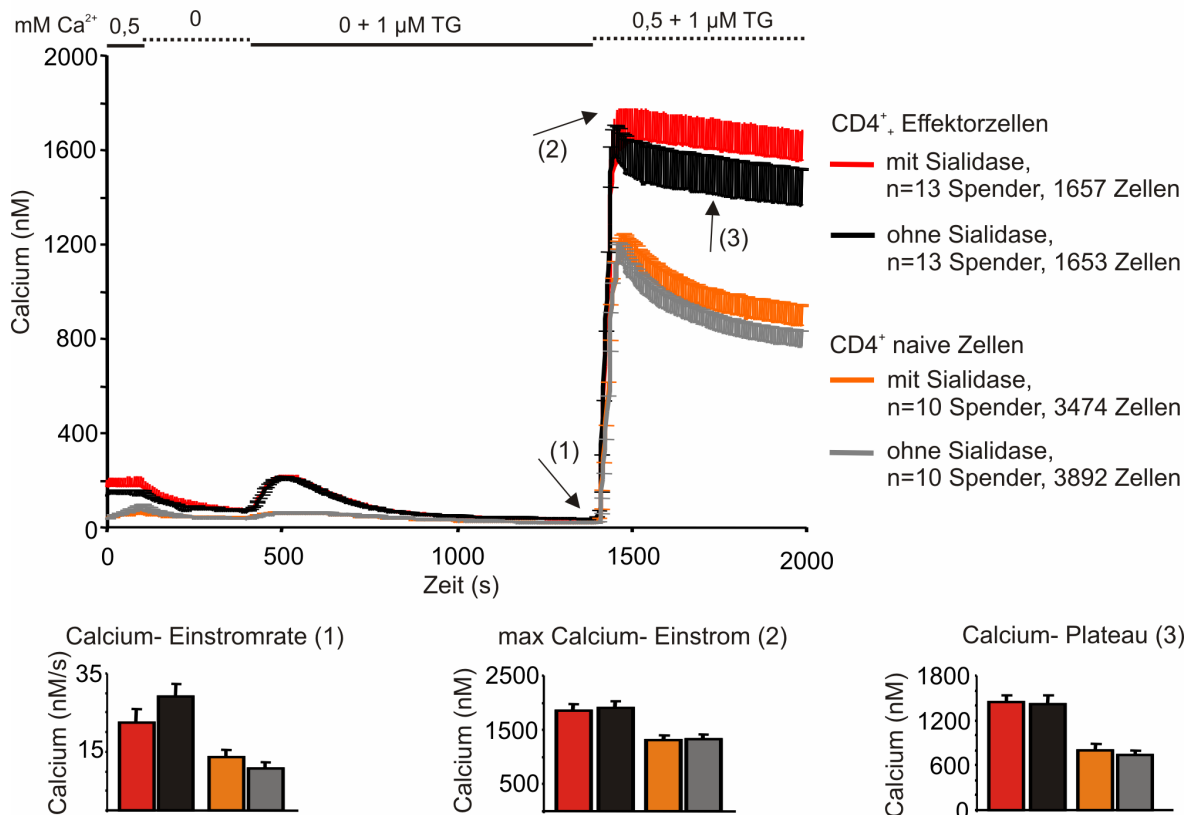


Abbildung 45: Calciumsignale in primären, humanen CD4^+ T Zellen nach Inkubation mit Sialidase (Neuraminidase) aus *Clostridium perfringens*. Die primären T Zellen wurden über Nacht mit 0,05 U/ml Sialidase (Neuraminidase) behandelt und in Fura 2AM basierenden Calciumionenkonzentrationsmessungen mit dem Ca^{2+} -Readdition Protokoll untersucht. Die Zellen befanden sich zu Beginn der Messung für 100 s in einer 0,5 mM Ca^{2+} -Lösung. Anschließend wurden die Zellen mit einer Ca^{2+} -freien Lösung perfundiert und weitere 300 s gemessen. Die Speicher wurden durch Zugabe von 1 μM Thapsigargin in Ca^{2+} -freier Lösung entleert (1000 s) und dann wurde der Calciumeinstrom über Kanäle in der Plasmamembran nach Perfusion mit 0,5 mM Ca^{2+} -haltiger Lösung bestimmt (600 s). Dargestellt ist die Veränderung der Calciumionenkonzentration im Cytoplasma der Zellen über den Zeitverlauf des Experiments. Die Balkendiagramme zeigen die statistische Auswertung der Versuche. Dargestellt sind die Calciumeinstromrate, der maximale Calciumeinstrom und das Calciumplateau gegen Ende der Messung. Insgesamt wurden die Zellen von dreizehn Spendern für die Effektorzellen und von zehn Spendern für die naiven Zellen untersucht.

Insgesamt wurden die Effektorzellen von dreizehn verschiedenen Spendern und die naiven Zellen von zehn verschiedenen Spendern analysiert. Wenn man die Messungen der einzelnen Spender separat betrachtet (siehe Tabelle 1, Seite 117), ist die Calciumeinstromrate in den behandelten Effektorzellen nur zweimal größer, als in den unbehandelten Zellen. Bei den naiven Zellen sind die behandelten Zellen sechsmal größer als die Kontrolle. Bei dem maximalen Calciumsignal liegt das Verhältnis bei den Effektorzellen bei sieben zu sechs und bei den naiven Zellen bei vier zu zehn. Auch im Calciumplateau sind die Ergebnisse sehr heterogen und die Verhältnisse liegen bei sechs zu sieben für die Effektorzellen und bei fünf zu fünf bei den naiven Zellen.

Das Enzym ST2, 3-Sialidase aus *Salmonella typhimurium* entfernt spezifisch Sialinsäuren an $\alpha 2, 3$ -Bindungen. Auch die Inkubation der CD4^+ Effektor T Zellen und der CD4^+ naiven T Zellen mit

diesem Enzym verändert die Calciumsignale dieser Zellen gegenüber den unbehandelten Zellen nicht (siehe Abbildung 46).

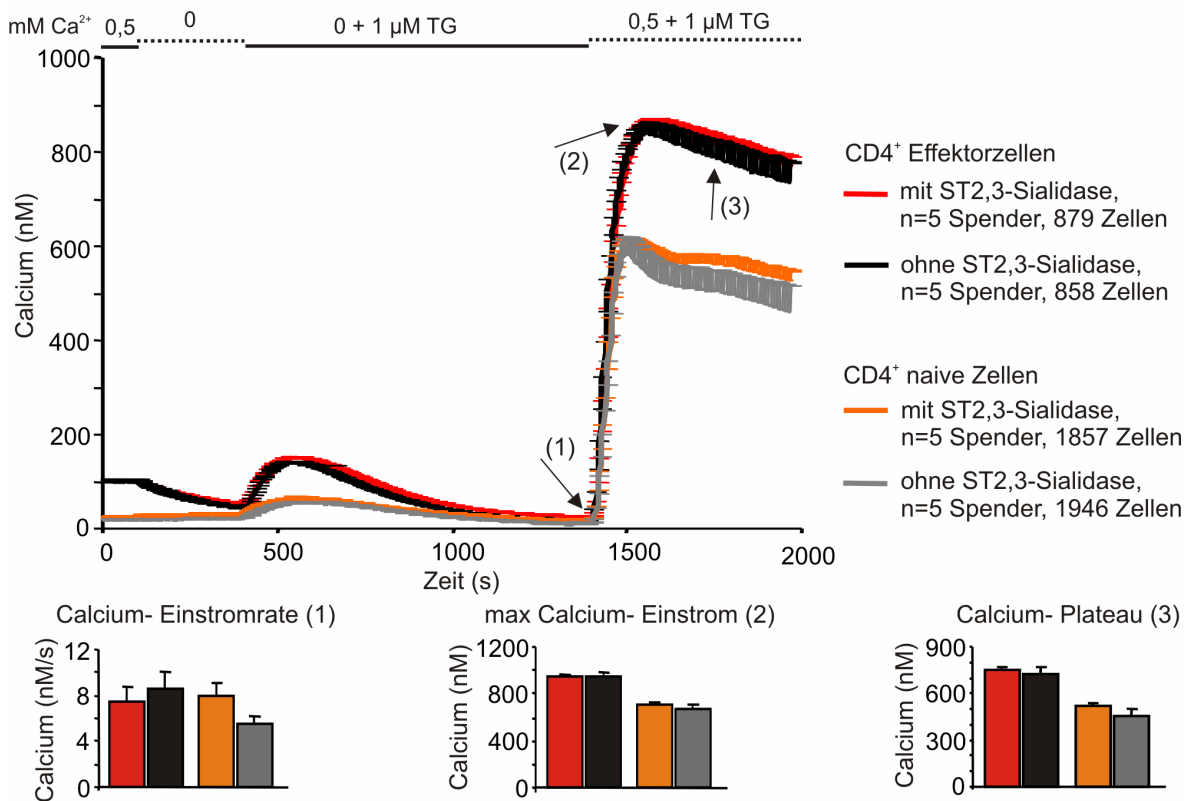


Abbildung 46: Calciumsignale in primären, humanen CD4⁺ T Zellen nach Inkubation mit ST2, 3 Sialidase aus *Salmonella typhimurium*. Die primären T Zellen wurden über Nacht mit 250 U/ml ST2, 3 Sialidase behandelt und in Fura 2AM basierenden Calciumionenkonzentrationsmessungen mit dem Ca²⁺- Readdition Protokoll untersucht. Die Zellen befanden sich zu Beginn der Messung für 100 s in einer 0,5 mM Ca²⁺-Lösung. Anschließend wurden die Zellen mit einer Ca²⁺-freien Lösung perfundiert und weitere 300 s gemessen. Die Speicher wurden durch Zugabe von 1 µM Thapsigargin in Ca²⁺-freier Lösung entleert (1000 s) und dann wurde der Calciumeinstrom über Kanäle in der Plasmamembran nach Perfusion mit 0,5 mM Ca²⁺-haltiger Lösung bestimmt (600 s). Dargestellt ist die Veränderung der Calciumionenkonzentration im Cytosol der Zellen über den Zeitverlauf des Experiments. Die Balkendiagramme zeigen die statistische Auswertung der Versuche. Dargestellt sind die Calciumeinstromrate, der maximale Calciumeinstrom und das Calciumplateau gegen Ende der Messung. Insgesamt wurden die Zellen von fünf Spendern für die Effektorzellen und die naiven Zellen untersucht.

Weder die Calciumeinstromrate, noch der maximale Calciumeinstrom oder das Calciumplateau sind im Mittel signifikant verschieden, wenn man die mit ST2, 3-Sialidase behandelten Zellen mit den Kontrollzellen vergleicht. Die Calciumeinstromrate in den behandelten Effektorzellen beträgt 7,46 nM Ca²⁺/s und in den Unbehandelten 8,56 nM Ca²⁺/s. In den naiven Zellen sind die Werte mit 7,94 nM Ca²⁺/s und 5,44 nM Ca²⁺/s auch nicht signifikant verschieden. Der maximale Calciumeinstrom in den behandelten Effektorzellen liegt mit 934 nM Ca²⁺ etwa gleich wie die unbehandelten Zellen mit 952 nM Ca²⁺. Die behandelten naiven Zellen erreichen einen maximalen Calciumeinstrom von 713 nM Ca²⁺ und die Unbehandelten von 673 nM Ca²⁺. Im Plateau erreichen die mit ST2, 3-Sialidase behandelten Effektorzellen einen Wert von 750 nM Ca²⁺ und die unbehandelten Zellen einen Wert von 723 nM Ca²⁺. Auch bei den naiven Zellen ist die Calciumionenkonzentration im Plateau mit Werten von 517 nM und 457 nM Ca²⁺ fast gleich.

Insgesamt wurden die naiven und Effektorzellen von fünf verschiedenen Spendern gemessen. Wenn man die Messungen der einzelnen Spender separat betrachtet (siehe Tabelle 2, Seite 119), ist die Calciumeinstromrate in den behandelten Effektorzellen einmal größer als in den unbehandelten Zellen, bei den naiven Zellen sind die behandelten Zellen viermal größer als die Kontrolle. Bei dem maximalen Calciumsignal liegt das Verhältnis bei den Effektorzellen bei eins zu vier und bei den naiven Zellen bei drei zu zwei. Im Calciumplateau liegen die Verhältnisse bei drei zu zwei für die Effektorzellen und bei vier zu eins bei den naiven Zellen.

Das Proteohormon Klotho wurde durch die Entdeckung seiner lebensverlängernden Funktion bei Mäusen (Kurosu et al, 2005) bekannt und schneidet spezifisch Sialinsäuren an $\alpha 2$, 6- Bindungen. Zudem ist bekannt, dass es die Verweildauer von TRPV 5 Kanälen in der Plasmamembran erhöht, und dadurch in die Ca^{2+} - Signalaktivität von Zellen eingreifen kann (Cha et al, 2008). In der vorliegenden Arbeit veränderte die Inkubation der CD4^+ Effektor T Zellen und der CD4^+ naiven T Zellen mit diesem Enzym die Calciumsignale nicht (siehe Abbildung 47).

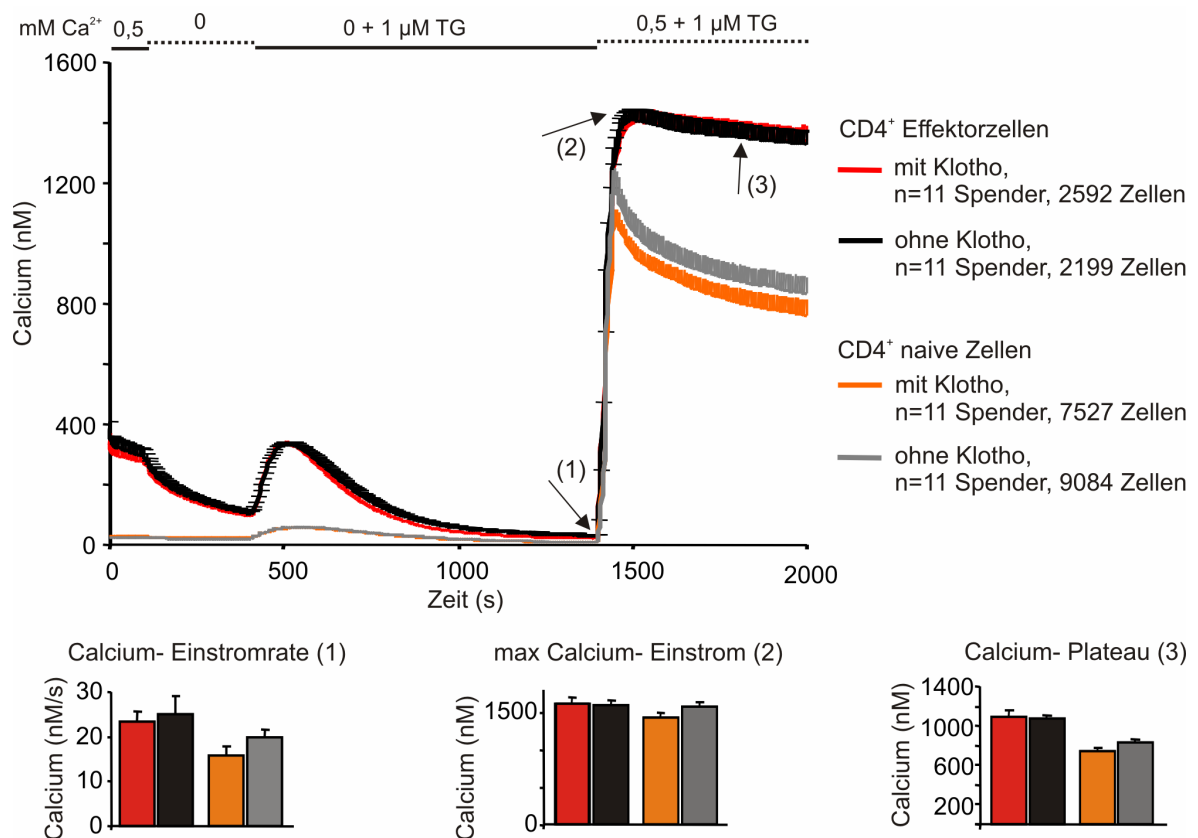


Abbildung 47: Calciumsignale in primären, humanen CD4^+ T Zellen nach Inkubation mit Klotho. Die primären T Zellen wurden über Nacht mit 100 pm Klotho behandelt und in Fura 2AM basierenden Calciumionenkonzentrationsmessungen mit dem Ca^{2+} - Readdition Protokoll untersucht. Die Zellen befanden sich zu Beginn der Messung für 100 s in einer 0,5 mM Ca^{2+} -Lösung. Anschließend wurden die Zellen mit einer Ca^{2+} -freien Lösung perfundiert und weitere 300 s gemessen. Die Speicher wurden durch Zugabe von 1 μM Thapsigargin in Ca^{2+} -freier Lösung entleert (1000 s) und dann wurde der Calciumeinstrom über Kanäle in der Plasmamembran nach Perfusion mit 0,5 mM Ca^{2+} -haltiger Lösung bestimmt (600 s). Dargestellt ist die Veränderung der Calciumionenkonzentration im Cytosol der Zellen über den Zeitverlauf des Experiments. Die Balkendiagramme zeigen die statistische Auswertung der Versuche. Dargestellt sind die Calciumeinstromrate, der maximale Calciumeinstrom und das Calciumplateau gegen Ende der Messung. Insgesamt wurden die Zellen von elf Spendern für die Effektorzellen und die naiven Zellen untersucht.
























Weder die Calciumeinstromrate, noch der maximale Calciumeinstrom oder das Calciumplateau sind im Mittel signifikant verschieden, wenn man die mit Klotho behandelten Zellen mit den Kontrollzellen vergleicht. Die Calciumeinstromrate in den behandelten Effektorzellen liegt mit 23,16 nM Ca^{2+} /s etwa gleich wie die unbehandelten Zellen mit 25,63 nM Ca^{2+} /s. Die behandelten naiven Zellen erreichen eine Calciumeinstromrate von 15,98 nM Ca^{2+} /s und die Unbehandelten von 19,97 nM Ca^{2+} /s. Im maximalen Calciumeinstrom erreichen die mit Klotho behandelten Effektorzellen einen Wert von 1345 nM Ca^{2+} und die unbehandelten Zellen einen Wert von 1327 nM Ca^{2+} . Auch bei den naiven Zellen ist die maximale Calciumionenkonzentration mit Werten von 1194 nM und 1306 nM Ca^{2+} fast gleich. Die Calciumionenkonzentration im Plateau in den behandelten Effektorzellen beträgt 1096 nM Ca^{2+} und in den unbehandelten Zellen 1068 nM Ca^{2+} . In den naiven Zellen sind die Werte mit 738 nM Ca^{2+} und 821 nM Ca^{2+} auch nicht signifikant verschieden.

Insgesamt wurden die naiven und Effektorzellen von elf verschiedenen Spendern gemessen. Bei Betrachtung der Messungen der einzelnen Spender (siehe Tabelle 3, Seite 120) fällt auf, dass die Calciumeinstromrate in den behandelten Effektorzellen zweimal größer, als in den sechs unbehandelten Kontrollen ist. Bei den naiven Zellen sind die behandelten Zellen zweimal größer als die acht Kontrollmessungen. Bei dem maximalen Calciumsignal liegt das Verhältnis bei den Effektorzellen bei fünf zu sechs und bei den naiven Zellen bei drei zu acht. Im Calciumplateau liegen die Verhältnisse bei sechs zu fünf für die Effektorzellen und bei zwei zu neun bei den naiven Zellen.

Bei allen Experimenten fällt auf, dass die Calciumsignale der Effektorzellen deutlich unterschiedlich zu denen der naiven Zellen sind. Das basale Ca^{2+} der Effektorzellen ist deutlich erhöht, der Calciumausstrom aus dem ER und der maximale Calciumeinstrom sind stark vergrößert. Allerdings bleibt zu beachten, dass die Effektorzellen deutlich größer sind, als die naiven T-Zellen. Zudem sind die Calciumsignale in der Messreihe mit der ST2, 3-Siase insgesamt kleiner als die Signale in den Messreihen mit Neuraminidase und Klotho. Dies könnte ein Spender-abhängiger Effekt sein.











Die analysierten Spender waren zwischen 18 und 71 Jahre alt. Die altersabhängige Betrachtung der Calciumsignale weist keine auffallende Verteilung oder signifikante Unterschiede auf.

Tabelle 1: Calciumsignale in primären, humanen CD4⁺ T Zellen nach Inkubation mit Sialidase (Neuraminidase) aus *Clostridium perfringens*. Die primären T Zellen wurden über Nacht mit 0,05 U/ml Sialidase (Neuraminidase) behandelt und in Fura 2AM basierenden Calciumionenkonzentrationsmessungen mit dem Ca²⁺-Readdition Protokoll untersucht. Dargestellt ist zunächst der Effekt der Behandlung auf die Ca²⁺ Einstromrate. Ein roter Pfeil nach unten bedeutet eine signifikante Reduktion, ein grüner Pfeil nach oben eine signifikante Erhöhung und ein schwarzer Strich keine signifikante Veränderung des Wertes nach Behandlung. Zudem sind die Werte für die Ca²⁺ Einstromrate, die maximale Ca²⁺ Konzentration in den Zellen und das Ca²⁺ Plateau einschließlich des sem Wertes tabellarisch aufgeführt.

Geburtsjahr des Spenders	1940	1945		1945		1956		1956
Zelltyp	eff	eff	naiv	eff	naiv	eff	naiv	eff
Effekt auf Ca ²⁺ Einstromrate								
Geburtsjahr des Spenders	1960		1962		1962		1963	
Zelltyp	eff	naiv	eff	naiv	eff	naiv	eff	
Effekt auf Ca ²⁺ Einstromrate								
Geburtsjahr des Spenders	1965		1967	1970	1973		1986	
Zelltyp	eff	naiv	eff	naiv	eff	naiv	eff	naiv
Effekt auf Ca ²⁺ Einstromrate								

Geburtsjahr des Spenders	1940		1945				1945			
Zelltyp, Behandlung und Anzahl gemessener Zellen	eff +, 71	eff -, 83	eff +, 265	eff -, 192	naiv +, 252	naiv -, 351	eff +, 249	eff -, 142	naiv +, 757	naiv -, 858
Ca ²⁺ Einstromrate	22.19 ± 3.29	36.66 ± 3.71	15.38 ± 1.14	32.54 ± 2.59	4.42 ± 0.25	6.78 ± 0.23	28.06 ± 1.28	40.93 ± 2.04	5.67 ± 0.15	2.42 ± 0.06
Ca ²⁺ Peak	1625.25 ± 81.86	1800.25 ± 76.82	1471.53 ± 60.17	2148.37 ± 86.5	885.79 ± 26.73	956.65 ± 20.6	2479.31 ± 58.56	2148.37 ± 86.49	1249.45 ± 50.96	1600.37 ± 62.9
Ca ²⁺ Plateau	1310.30 ± 66.19	1400.25 ± 61.46	1249.45 ± 50.97	1600.37 ± 62.9	543.31 ± 28.16	614.64 ± 21.97	885.79 ± 53.37	956.648 ± 20.58	962.69 ± 26.45	391.27 ± 17.66
Geburtsjahr des Spenders	1956				1956		1960			
Zelltyp, Behandlung und Anzahl gemessener Zellen	eff +, 51	eff -, 74	naiv +, 167	naiv -, 417	eff +, 74	eff -, 108	eff +, 45	eff -, 38	naiv +, 639	naiv -, 553
Ca ²⁺ Einstromrate	16.02 ± 1.88	13.71 ± 1.55	16.99 ± 0.75	7.57 ± 0.16	31.42 ± 2.69	34.85 ± 2.91	14.33 ± 1.89	25.03 ± 3.74	13.11 ± 0.43	12.49 ± 0.35
Ca ²⁺ Peak	1230.41 ± 72.19	999.46 ± 61.4	1274.63 ± 42.67	1026.69 ± 26.18	2119.85 ± 66.05	2164.61 ± 70.27	1813.51 ± 100.28	1493.07 ± 90.19	1530.49 ± 33.91	1542.37 ± 25.27
Ca ²⁺ Plateau	1038.70 ± 65.65	720.99 ± 55.56	646.22 ± 35.65	477.77 ± 18.43	1772.05 ± 55.04	1784.22 ± 51.32	1527.51 ± 83.80	1222.47 ± 82.51	1091.53 ± 29.76	922.16 ± 23.04
Geburtsjahr des Spenders	1962				1962				1963	
Zelltyp, Behandlung und Anzahl gemessener Zellen	eff +, 295	eff -, 307	naiv +, 147	naiv -, 234	eff +, 79	eff -, 29	naiv +, 147	naiv -, 254	eff +, 93	eff -, 51
Ca ²⁺ Einstromrate	54.06 ± 3.57	35.78 ± 2.63	12.18 ± 0.32	15.61 ± 0.44	14.45 ± 2.63	29.05 ± 4.94	11.38 ± 0.62	8.42 ± 0.28	23.65 ± 2.00	26.44 ± 3.38
Ca ²⁺ Peak	2175.29 ± 44.47	1454.64 ± 53.55	980.26 ± 15.97	1416.66 ± 25.61	1486.44 ± 45.35	1720.68 ± 149.67	1102.17 ± 28.93	1549.86 ± 33.2	2660.12 ± 111.48	2098.41 ± 121.37
Ca ²⁺ Plateau	1529.34 ± 33.12	1090.50 ± 37.59	591.94 ± 13.04	604.67 ± 18.77	1275.89 ± 33.85	1382.48 ± 126.94	524.76 ± 25.27	26.42	2009.96 ± 82.38	1756.72 ± 100.17
Geburtsjahr des Spenders	1965				1967		1970			
Zelltyp, Behandlung und Anzahl gemessener Zellen	eff +, 30	eff -, 96	naiv +, 254	naiv -, 157	eff +, 102	eff -, 100	naiv +, 156	naiv -, 244		
Ca ²⁺ Einstromrate	15.36 ± 3.05	36.49 ± 2.67	9.99 ± 0.34	11.23 ± 0.28	5.69 ± 0.58	14.17 ± 1.05	20.1 ± 0.9	19.99 ± 0.9		
Ca ²⁺ Peak	1539.43 ± 145.12	2525.53 ± 65.73	1676.04 ± 344.15	853.43 ± 14.84	1417.47 ± 65.45	2349.48 ± 85.55	1371.55 ± 37.04	1458.82 ± 40.54		
Ca ²⁺ Plateau	1252.61 ± 102.92	1830.01 ± 42.06	1153.3 ± 26.74	627.53 ± 14.99	1116.32 ± 61.09	1828.86 ± 65.11	996.15 ± 36.96	1010.06 ± 37.3		
Geburtsjahr des Spenders	1973				1986					
Zelltyp, Behandlung und Anzahl gemessener Zellen	eff +, 168	eff -, 60	naiv +, 586	naiv -, 484	eff +, 135	eff -, 331	naiv +, 369	naiv -, 440		
Ca ²⁺ Einstromrate	16.61 ± 1.13	12.33 ± 1.67	19.26 ± 0.64	9.97 ± 0.35	33.18 ± 2.21	42.30 ± 2.15	22.67 ± 0.79	11.85 ± 0.38		
Ca ²⁺ Peak	1583.62 ± 48.55	1420.22 ± 86.53	1635.49 ± 25.02	1466.80 ± 34.09	2417.61 ± 60.2	2342.01 ± 56.38	1427.83 ± 31.27	1344.10 ± 36.13		
Ca ²⁺ Plateau	1312.98 ± 42.97	1125.4 ± 76.29	1129.29 ± 22.66	833.62 ± 26.87	1939.52 ± 49.75	1756.02 ± 52.65	778.3 ± 26.18	755.61 ± 29.71		

Tabelle 2: Calciumsignale in primären, humanen CD4⁺ T Zellen nach Inkubation mit mit ST2, 3 Siase aus *Salmonella typhimurium*.. Die primären T Zellen wurden über Nacht mit 250 U/ml ST2, 3 Sialidase behandelt und in Fura 2AM basierenden Calciumionenkonzentrationsmessungen mit dem Ca²⁺- Readdition Protokoll untersucht. Dargestellt ist zunächst der Effekt der Behandlung auf die Ca²⁺ Einstromrate. Ein roter Pfeil nach unten bedeutet eine signifikante Reduktion, ein grüner Pfeil nach oben eine signifikante Erhöhung und ein schwarzer Strich keine signifikante Veränderung des Wertes nach Behandlung. Zudem sind die Werte für die Ca²⁺ Einstromrate, die maximale Ca²⁺ Konzentration in den Zellen und das Ca²⁺ Plateau einschließlich des sem Wertes tabellarisch aufgeführt.

Geburtsjahr des Spenders	1959		1963		1963	
Zelltyp	eff	naiv	eff	naiv	eff	naiv
Effekt auf Ca ²⁺ Einstromrate						
Geburtsjahr des Spenders	1976		1986			
Zelltyp	eff	naiv	eff	naiv		
Effekt auf Ca ²⁺ Einstromrate						

Geburtsjahr des Spenders	1959				1963			
Zelltyp, Behandlung und Anzahl gemessener Zellen	eff +, 282	eff -, 214	naiv +, 388	naiv -, 405	naiv +, 307	naiv -, 253	eff +, 534	eff -, 577
Ca ²⁺ Einstromrate	7.07 ± 0.44	10.92 ± 0.77	8.56 ± 0.31	5.18 ± 0.22	10.06 ± 0.54	8.06 ± 0.55	10.06 ± 0.26	3.67 ± 0.11
Ca ²⁺ Peak	1011.64 ± 24.19	899.34 ± 27.29	710.51 ± 17.21	665.49 ± 16.57	924.99 ± 20.86	952.15 ± 23.99	756.16 ± 15.48	674.38 ± 13.65
Ca ²⁺ Plateau	816.23 ± 21.73	672.82 ± 25.6	551.84 ± 18.28	470.97 ± 16.75	723.72 ± 19.94	753.4 ± 22.02	550.8 ± 15.22	453.3 ± 13.48
Geburtsjahr des Spenders	1963				1976			
Zelltyp, Behandlung und Anzahl gemessener Zellen	eff +, 43	eff -, 80	naiv +, 239	naiv -, 202	eff +, 122	eff -, 150	naiv +, 316	naiv -, 386
Ca ²⁺ Einstromrate	3.96 ± 0.81	4.019 ± 0.47	7.77 ± 0.22	5.56 ± 0.19	6.5 ± 0.43	11.56 ± 0.85	9.1 ± 0.21	7.69 ± 0.18
Ca ²⁺ Peak	908.53 ± 62.07	966.14 ± 57.75	691.82 ± 18.15	533.58 ± 17.17	946.79 ± 29.77	1060.49 ± 35.88	685.0 ± 16.57	753.46 ± 14.1
Ca ²⁺ Plateau	733.16 ± 50.43	684.41 ± 45.87	466.09 ± 18.73	328.60 ± 18.35	754.74 ± 28.06	860.96 ± 34.33	507.67 ± 16.85	584.57 ± 16.95
Geburtsjahr des Spenders	1986							
Zelltyp, Behandlung und Anzahl gemessener Zellen	eff +, 125	eff -, 161	naiv +, 380	naiv -, 376				
Ca ²⁺ Einstromrate	9.72 ± 0.85	8.27 ± 0.66	4.22 ± 0.21	5.14 ± 0.24				
Ca ²⁺ Peak	880.96 ± 34.31	883.2 ± 34.02	721.77 ± 18.09	738.38 ± 21.18				
Ca ²⁺ Plateau	724.62 ± 35.13	644.31 ± 30.02	511.33 ± 16.56	450.43 ± 18				

Tabelle 3: Calciumsignale in primären, humanen CD4⁺ T Zellen nach Inkubation mit Klotho. Die primären T Zellen wurden über Nacht mit 100 pm Klotho behandelt und in Fura 2AM basierenden Calciumionenkonzentrationsmessungen mit dem Ca²⁺- Readdition Protokoll untersucht. Dargestellt ist zunächst der Effekt der Behandlung auf die Ca²⁺ Einstromrate. Ein roter Pfeil nach unten bedeutet eine signifikante Reduktion, ein grüner Pfeil nach oben eine signifikante Erhöhung und ein schwarzer Strich keine signifikante Veränderung des Wertes nach Behandlung. Zudem sind die Werte für die Ca²⁺ Einstromrate, die maximale Ca²⁺ Konzentration in den Zellen und das Ca²⁺ Plateau einschließlich des sem Wertes tabellarisch aufgeführt.

Geburtsjahr des Spenders	1969		1957		1962		1978	
Zelltyp	eff	naiv	eff	naiv	eff	naiv	eff	naiv
Effekt auf Ca ²⁺ Einstromrate	—	↓	↑	↓	↑	—	↓	↑
Geburtsjahr des Spenders	1981		1970		1963		1955	
Zelltyp	eff	naiv	eff	naiv	eff	naiv	eff	naiv
Effekt auf Ca ²⁺ Einstromrate	—	↓	—	↓	↓	↓	—	↓
Geburtsjahr des Spenders	1968		1957		1945			
Zelltyp	eff	naiv	eff	naiv	eff	naiv		
Effekt auf Ca ²⁺ Einstromrate	—	↓	—	↓	—	↑		

Geburtsjahr des Spenders	1969				1957			
Zelltyp, Behandlung und Anzahl gemessener Zellen	eff+, 184	eff-, 156	naiv+, 225	naiv-, 567	eff+, 109	eff-, 168	naiv+, 161	naiv-, 345
Ca ²⁺ Einstromrate	27.51 ± 1.94	35.72 ± 2.73	13.66 ± 0.7	29.16 ± 0.73	26.16 ± 1.99	5.92 ± 0.76	7.64 ± 0.48	18.91 ± 0.74
Ca ²⁺ Peak	1288.01 ± 36.42	1418.76 ± 45.65	1131.67 ± 28.32	1333.01 ± 16.93	1604.33 ± 52.35	1259.28 ± 34.86	997.39 ± 34.89	1152.84 ± 22.88
Ca ²⁺ Plateau	1050.22 ± 35.46	1114.99 ± 41.25	681.52 ± 28.43	848.51 ± 15.34	1348.93 ± 46.19	1079.82 ± 34.87	503.17 ± 28.36	656.05 ± 20.43
Geburtsjahr des Spenders	1962				1978			
Zelltyp, Behandlung und Anzahl gemessener Zellen	eff+, 332	eff-, 269	naiv+, 216	naiv-, 346	eff+, 442	eff-, 187	naiv+, 1120	naiv-, 511
Ca ²⁺ Einstromrate	23.25 ± 0.97	14.64 ± 1.24	13.67 ± 0.64	14.31 ± 0.32	32.8 ± 1.54	48.06 ± 2.02	21.22 ± 0.36	18.72 ± 0.4
Ca ²⁺ Peak	1309.21 ± 21.45	1322.68 ± 30.23	988.78 ± 27.61	1169.53 ± 21.19	1499.05 ± 22.38	1521.39 ± 25.38	1334.35 ± 11.46	1388.22 ± 17.41
Ca ²⁺ Plateau	1069.68 ± 19.37	1049.15 ± 25.89	528.13 ± 25.25	630.43 ± 17.9	1185.95 ± 18.11	1213.66 ± 20.95	869.31 ± 9.78	835.8 ± 14.06

Geburtsjahr des Spenders	1981				1970			
Zelltyp, Behandlung und Anzahl gemessener Zellen	eff+, 191	eff-, 123	naiv+, 939	naiv-, 999	eff+, 284	eff-, 323	naiv+, 520	naiv-, 1140
Ca²⁺ Einstromrate	19.93 ± 1.2	22.71 ± 1.46	26.38 ± 0.42	23.19 ± 0.42	22.53 ± 1.08	18.44 ± 0.89	14.08 ± 0.36	21.93 ± 0.29
Ca²⁺ Peak	1008.91 ± 28.47	981.81 ± 30.69	1329.74 ± 11.64	1141.04 ± 11.28	1532.05 ± 29.81	1353.24 ± 25.21	1170.421 ± 21.88	1529.52 ± 13.08
Ca²⁺ Plateau	756.1 ± 26.96	730.32 ± 28.99	838.68 ± 10.63	757.43 ± 11.52	1272.37 ± 25.03	1177.4 ± 22.89	826.98 ± 20.85	1040.84 ± 10.9
Geburtsjahr des Spenders	1963				1955			
Zelltyp, Behandlung und Anzahl gemessener Zellen	eff+, 252	eff-, 178	naiv+, 482	naiv-, 842	eff+, 213	eff-, 207	naiv+, 973	naiv-, 936
Ca²⁺ Einstromrate	24.78 ± 2.14	34.4 ± 2.05	10.57 ± 0.3	14.32 ± 0.29	21.16 ± 1.71	18.95 ± 1.12	17.18 ± 0.39	24.69 ± 0.45
Ca²⁺ Peak	1644.89 ± 39	1487.06 ± 36.15	1123.89 ± 24.22	1518.52 ± 15.4	1156.18 ± 31.37	1240.34 ± 32.36	1198.12 ± 13.91	1170.92 ± 13.58
Ca²⁺ Plateau	1368.62 ± 25.4	1252.06 ± 31.95	716.99 ± 22.18	1004.12 ± 14.61	998.23 ± 28.19	1020.40 ± 29.87	731.99 ± 11.77	740.69 ± 12.69
Geburtsjahr des Spenders	1968				1957			
Zelltyp, Behandlung und Anzahl gemessener Zellen	eff+, 224	eff-, 315	naiv+, 999	naiv-, 1237	eff+, 180	eff-, 154	naiv+, 999	naiv-, 1162
Ca²⁺ Einstromrate	3.62 ± 0.52	17.59 ± 0.87	9.84 ± 0.18	13.04 ± 0.38	26.45 ± 1.08	37.16 ± 1.97	21.28 ± 0.37	25.08 ± 0.4
Ca²⁺ Peak	1218.01 ± 31.87	1284.76 ± 26.04	1033.47 ± 12.11	990.29 ± 11.06	1098.81 ± 29.47	1352.92 ± 35.80	1391.97 ± 12.28	1450.84 ± 13.3
Ca²⁺ Plateau	905.70 ± 9.26	998.68 ± 24.42	588.61 ± 12.17	604.63 ± 10.3	913.47 ± 28.68	1021.67 ± 30.16	938.11 ± 10.04	943.67 ± 9.42
Geburtsjahr des Spenders	1945							
Zelltyp, Behandlung und Anzahl gemessener Zellen	eff+, 181	eff-, 119	naiv+, 893	naiv-, 999				
Ca²⁺ Einstromrate	27.76 ± 1.4	22.9 ± 1.56	20.37 ± 0.42	16.37 ± 0.42				
Ca²⁺ Peak	1439.39 ± 36.07	1384.07 ± 42.9	1443.11 ± 16.27	1526.08 ± 15.05				
Ca²⁺ Plateau	1191.36 ± 31.68	1093.40 ± 39.57	897.79 ± 13.55	974.97 ± 12.8				

6.17 Ein Modell um die CRAC Kanal Aktivierung durch STIM1DQ beschreiben zu können

Um die Aktivierung von Orai1 durch STIM1DQ und den dadurch entstehenden Phänotyp zusammenfassend erklären zu können, wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Heiko Rieger (Theoretische Physik, Universität des Saarlandes, Saarbrücken) ein mathematisches Modell entwickelt. Die dazugehörigen Computersimulationen basieren auf einem zweidimensionalen Gillespie Monte Carlo Algorithmus. Es wird angenommen, dass alle Monomere/Oligomere innerhalb einer zweidimensionalen Ebene frei diffundieren können. Weil die CRAC Kanal Aktivierung ein lokaler Prozess ist, beschreibt das Modell die PM und ER-Membran als einen Bereich von 15×15 Zellen (je $(0,2 \mu\text{m})^2$) wie Abbildung 48A zeigt. STIM1 Dimere im ER können Orai1 Tetramere in der PM binden und einen der vier folgenden Zustände einnehmen: OS_1 , OS_2 , OS_3 oder OS_4 , bestehend aus einem Orai1 Tetramer und einem bis vier STIM1 Dimeren. Die STIM1-Orai1 Bindung ist ein negativ kooperativer Prozess, d.h. je mehr STIM1 Moleküle bereits gebunden sind, umso schwerer ist die Anlagerung weiterer STIM1 Moleküle an den Komplex. Dieser Prozess wird durch den Faktor der negativen Kooperativität α beschrieben. Allerdings nimmt die Stabilität des Komplexes auch mit der zunehmenden Anzahl gebundener STIM1 Moleküle zu, was durch den Faktor der Kooperativität β beschrieben wird. Die Wahrscheinlichkeit der verschiedenen Besetzungszustände ist somit nicht gleich und diese tragen demnach unterschiedlich zur endgültigen Stromdichte bei: $I_{\text{CRAC}} = 0.001 \cdot OS_1 + 0.025 OS_2 + 0.275 OS_3 + 1.0 OS_4$. Angenommen wird auch eine ansteigende Offenwahrscheinlichkeit des Kanals mit der Anzahl gebundner STIM1 Moleküle. Zusätzlich zu dem STIM1WT Protein wurden vier verschiedenen Mutanten modelliert: Mutante A zeigt eine stärkere Oligomerisierung der STIM1 Monomere ($10 \cdot k_1(WT) = k_1(A)$), Mutante B eine stärkere STIM1 zu Orai1 Bindung ($10 \cdot k_i(WT) = k_i(B), i \in \{1,2,3,4\}$), Mutante C eine Erniedrigung der negativen Kooperativität bei der Bindung der STIM1 an Orai1 ($\alpha(C) = 1.5 \neq \alpha(WT) = 5$) und Mutante D eine erhöhte STIM1 Dimer-Diffusion ($10 \cdot D_{\text{STIM1}}(WT) = D_{\text{STIM1}}(D)$).

Tabelle 4: Modellkonfigurationen und -parameter

	Species	D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	Reactions	Rate
	STIM1	0.1 [3]	k_3	k_{on}
	STIM1-dimer	0.05 [3]	k_5	$k_{on} \cdot 1/\alpha$
	Orai	0.07 [4]	k_7	$k_{on} \cdot 1/\alpha^2$
	CRAC-PM	0.0	k_9	$k_{on} \cdot 1/\alpha^3$
	Reactions	Rate	k_4	k_{off}
	k_{on}	$1.5 \cdot 10^8 [1/\text{Ms}]$	k_6	$k_{off} \cdot 1/\beta$
	k_{off}	0.8 [1/s]	k_8	$k_{off} \cdot 1/\beta^2$
	k_1	$10^8 [1/\text{Ms}]$	k_{10}	$k_{off} \cdot 1/\beta^3$
	k_2	0.05 [1/s]	α	5
#STIM1 monomers: 6000				

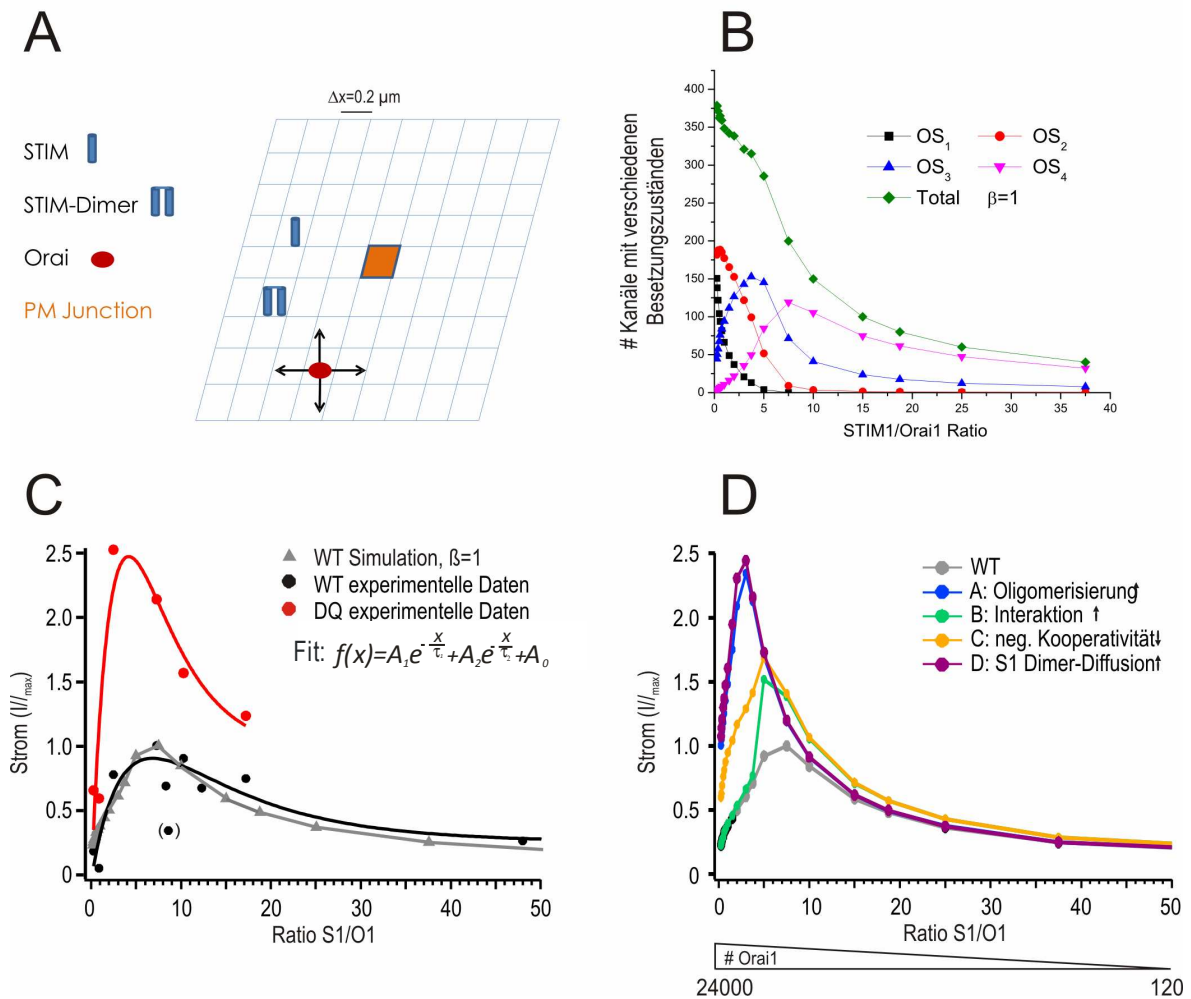


Abbildung 48: Modell zur Erklärung des STIM1DQ Phänotyps. **A.** Modell Geometrie. Die Größe der ER-PM Junctions beträgt $(0,2 \mu\text{m})^2$. **B.** Verteilung der verschiedenen Besetzungszustände des Orai1 Kanals. Die endgültige Stromdichte wird v.a. durch die Kanäle in dem Zustand OS₄ dominiert werden. **C** Normalisierte Stromdichte aufgetragen gegen das STIM1:Orai1 Verhältnis für gemessene STIM1WT (schwarze Kreise) und STIM1DQ Werte (rote Kreise) und modellierte STIM1WT Werte (graue Dreiecke). **D.** Normalisierte Stromdichte aufgetragen gegen das STIM1:Orai1 Verhältnis modellierte STIM1WT Werte (graue Kreise) und die verschiedenen Mutanten (farbig).

Das Modell beschreibt eine maximale Stromdichte von I_{CRAC} bei einem STIM1:Orai1 Verhältnis von 7,5, mit steil abfallenden Werten für höhere oder niedrigere Orai1 Konzentrationen (siehe Abbildung 48C, graue Dreiecke). In diesem Bereich ist die Anzahl der Orai1 Kanäle im OS₃- und OS₄- Zustand hoch und die im OS₂- und OS₁- Zustand relativ gering (siehe Abbildung 48B). Durch die Kombination der Orai1 Kanäle in den verschiedenen Besetzungszuständen wird letztendlich die Stromdichte von I_{CRAC} bestimmt. Die Offenwahrscheinlichkeit eines Kanals in OS₁ ist viel geringer, als die eines Kanals in OS₄. Je mehr Kanäle sich im OS₄ Zustand befinden, umso höher ist die Stromdichte. Abbildung 48C zeigt, dass die gemessenen, normalisierten STIM1WT vermittelten CRAC Stromdichten sehr gut zu den modellierten Daten passen, allerdings weichen die STIM1DQ vermittelten Werte, normalisiert auf die WT-Werte, stark von den theoretisch berechneten Werten ab. Da die FRET Experimente eine schnellere Translokation der STIM1DQ Moleküle zur PM aufwiesen, wurden verschiedene Mutanten modelliert. Abbildung 48D zeigt die berechnete Stromdichte im Verhältnis zum STIM1:Orai1 Ratio. Es wird klar, dass eine alleinige Verstärkung der STIM1-Orai1 Interaktion (Mutante B) oder eine Aufhebung der negativen Kooperativität (Mutante C) nicht

den STIM1DQ Phänotyp beschreiben kann. Allerdings kann eine theoretisch angenommene Erhöhung der Oligomerisierungsrate der STIM1 Moleküle (Mutante A) oder eine erhöhte Dimer-Diffusionsrate (Mutante D) den STIM1DQ Phänotyp imitieren. Dieses Modell zeigt, dass der STIM1DQ Phänotyp durch eine Kombination von erhöhter Translokationsrate zusammen mit einem veränderten STIM1:Orai1 Verhältnis entstehen kann.

7 Diskussion

7.1 Bedeutung der Glykosylierung von Oberflächenproteinen für die Calciumsignale in T-Zellen

Der Glykosylierung wird eine sehr wichtige Funktion bei der Reifung, dem Turnover, der Faltung und dem Trafficking von Proteinen, sowie der Zelladhäsion, der Rezeptorbindung und der Aktivierung von Zellen zugesprochen. Die Glykosylierung einzelner Proteine entsteht durch die kombinatorische Aktivität von Glykosyltransferasen und Glykosidasen, von denen im Säuger genom mehr als 200 kodiert sind. Eine besondere Bedeutung spielen die Zuckerketten bei der Entwicklung und der Funktion des Immunsystems (Marth & Grewal, 2008). Im natürlichen Alterungsprozess oder bei bestimmten Erkrankungen, wie z.B. Krebs, kann ein Rückgang der Immunfunktion des adaptiven und des angeborenen Immunsystems beobachtet werden. Diesem Phänomen liegt eine Reduktion der T-Zellfunktion zugrunde, die teilweise mit veränderten Glykosylierungsmustern von Oberflächenproteinen korreliert werden kann (Berger et al, 2006). Die reduzierte T-Zellaktivität könnte mit veränderten Calciumsignalen innerhalb der Zelle zusammenhängen, wobei der vorherrschende Mechanismus zur Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration in T-Zellen der speichergesteuerte Calciumeinstrom (SOCE; CRAC) darstellt. CRAC wird durch das Zusammenspiel der beiden Proteine STIM1 und Orai1 vermittelt, welches beide N-glykosylierte Proteine darstellen. Während STIM1 ein überwiegend im ER lokalisiertes Protein ist, befindet sich das Orai1 Protein in der Plasmamembran. Die Orai1 Glykosylierung an Position N223 wird nach außen exponiert, so dass Glykanmodifikationen prinzipiell über extrazelluläre Enzyme möglich sind. In der vorliegenden Arbeit sollte daher zunächst untersucht werden, ob die Veränderung der Glykosylierungsmuster von T-Zellproteinen einen Einfluss auf die Calciumsignale innerhalb der Zellen hat.

Werden Jurkat T-Zellen mit Tunicamycin behandelt, welches den Transfer von N-Acetylglucosamin-1-Phosphat von UDP-N-Acetylglucosamin auf Dolichol-Phosphat und damit den ersten Schritt der N-Glykosylierung hemmt, werden Proteine sowohl mit basalen (Endo H sensitiv) als auch mit komplexen (Endo H resistent) N-Glykosylierungsmustern beeinflusst. Die so behandelten Zellen zeigten vergrößerte Calciumsignale in Fura 2AM basierenden Calciumionenkonzentrationsbestimmungen und vergrößerte Calciumströme in CRAC spezifischen Patch-clamp Messungen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Glykosylierung von Proteinen, die an der Aktivierung und dem Erhalt des CRAC Stroms beteiligt sind, eine wichtige Funktion spielt. Da Tunicamycin aber neben der Inhibition der N-Glykosylierung einen Zellzyklusarrest in der G1 Phase initiieren kann (Hsu et al, 2009) und der Zellzyklus einen Einfluss auf die Größe des CRAC Stroms hat (Smyth et al, 2009, Tani et al, 2007), wurden die Zellen parallel mit Mimosin behandelt und ebenso untersucht. Mimosin arretiert Zellen ebenfalls in der G1 Phase des Zellzyklus (Chen et al, 2007). Die mit Mimosin behandelten Zellen zeigen eine Reduktion von SOCE und I_{CRAC} . Dies deutet darauf hin, dass der Zellzyklusarrest in G1 nicht die Ursache für den Tunicamycineffekt sein kann. Die Westernblot Analysen zeigen, dass Orai1 PNGase sensitiv, EndoH resistent und damit komplex glykosyliert ist. STIM1 ist EndoH sensitiv und verbleibt in einem Mannose-reichen Zustand. Dies liegt daran, dass das STIM1 Protein direkt in das ER translatiert wird und dort verbleibt. Das Orai1 Protein hingegen wird durch den Golgi-Apparat hin zur Plasmamembran transportiert, im Golgi-Apparat werden Glykanketten von weiteren Glycosyltransferasen und modifizierenden Enzymen

bearbeitet. Um herauszufinden, ob der Tunicamycineffekt durch STIM1 oder Orai1 vermittelt wird, wurden die Zellen mit Swainsonin behandelt. Diese Substanz hemmt ein Enzym innerhalb des Golgi-Apparates und somit den Verlauf der komplexen Glykosylierung und dürfte demnach lediglich Orai1 beeinflussen. Nach Behandlung der Zellen mit Swainsonin ist die Calciumeinstromrate deutlich erhöht, die Stromdichte nur tendenziell erhöht und der maximale Calciumeinstrom weist keinen Unterschied auf. Diese Ergebnisse weisen auf einen möglichen stärkeren Einfluss von STIM1 als von Orai1 für die Modifikation von I_{CRAC} durch Tunicamycin hin, allerdings sind sie nicht eindeutig, da die Substanzen mit denen die Zellen behandelt werden, nicht nur STIM1 und Orai1, sondern auch viele andere Proteine modifizieren.

Berger et al zeigten, dass die Behandlung von T-Zellen mit O-sialoglycoprotein endopeptidase (OSGE) das intrazelluläre Calciumsignal nach Rezeptorstimulation erhöht und Behandlung mit ST2, 3-Siase die Cytokinproduktion steigern kann. Diese Versuche weisen somit auf eine verstärkte Aktivierung der T-Zellen nach Entfernung von einzelnen Sialinsäureresten hin. Nachdem die Inhibierung der gesamten N-Glykosylierung mit Tunicamycin I_{CRAC} und SOCE vergrößerte, sollte auch der Effekt von einzelnen Zuckermifikationen in primären humanen T-Zellen untersucht werden. Zur Modifikation der Glykosylierung der Oberflächenproteine von T-Zellen wurden verschiedene Neuraminidasen verwendet. Die Neuraminidase aus *Clostridium perfringens* spaltet Sialinsäuren in $\alpha 2,3$ -, $\alpha 2,6$ - und $\alpha 2,8$ -Bindung. Das Enzym ST2, 3-Siase aus *Salmonella typhimurium* entfernt spezifisch Sialinsäuren an $\alpha 2, 3$ - Bindungen. Das Proteohormon Klotho schneidet spezifisch Sialinsäuren an $\alpha 2, 6$ - Bindungen. Die Calciumsignale der so behandelten $CD4^+$ Effektor T Zellen und der $CD4^+$ naiven T Zellen wurden in Fura 2AM basierenden Calciumimagingexperimenten mit einem Ca^{2+} - Readditionprotokoll untersucht. Keines der angegeben Enzyme veränderte das Calciumsignaling in den $CD4^+$ T Zellen signifikant, wobei die Ergebnisse von Spender zu Spender etwas variierten. Im Mittel jedoch waren die Calciumeinstromrate und der maximale Calciumeinstrom von behandelten und unbehandelten Zellen nicht verschieden.

Die verstärkte Aktivierung der T-Zellen die von Berger et al. beschrieben wurde, ist allerdings nach Rezeptorstimulation sichtbar. Dies deutet darauf hin, dass die Sialinsäuren eine Rolle bei der Aktivierung der Zelle nach Rezeptorstimulation spielen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Calciumsignale in den T-Zellen lediglich nach Speicherentleerung mit Tg ermittelt. Es bleibt zu überlegen, ob die durchgeführten Versuche in einem Protokoll mit Rezeptorstimulation wiederholt werden sollten. Die Funktionalität des Orai1 Kanals ist nicht abhängig von der Anwesenheit der Sialinsäuren an der Zuckerkette an Position N223, allerdings könnte die Orai1 Aktivierung nach Rezeptorstimulation in den mit Neuraminidasen behandelten Zellen verändert sein. Lyoudino et al. zeigten 2008, dass sich die in ruhenden Zellen frei verteilten Proteine STIM1 und Orai1 nach Ausbildung einer Immunologischen Synapse (IS) in T-Zellen umverteilen und an der IS konzentrieren (Lioudyno et al, 2008). Es ist vorstellbar, dass bei der Verankerung der Proteine an der IS große Zuckerketten eine Rolle spielen könnten.

7.2 Die glykosylierungsdefizienten Orai1- und STIM1 Mutanten

Der speichergesteuerte Calciumeinstrom wird durch die Proteine STIM1, als ER-ständiger Calciumsensor, und Orai1, als PM ständiger Calciumkanal, vermittelt. Beide Proteine sind N-glykosylierte Proteine. Das Orai1 Protein besitzt eine Glykosylierungsstelle an Aminosäureposition N223 und das STIM1 Protein besitzt zwei Glykosylierungsstellen an den Positionen N131 und

N171. Durch Einführung gezielter Punktmutationen wurden die Asparagine an denen die Zuckerketten hängen zu anderen Aminosäuren mutiert und die Folge der Mutationen im Überexpressionssystem untersucht. Hierzu wurden die Konstrukte in HEK293 Zellen transfiziert und die Zellen anschließend in Fura 2AM basierenden Calciumimagingexperimenten, in Patch-clamp Experimenten oder proteinbiochemisch untersucht. Mutiert man das Asparagin an Position 223 im Orai Protein zu einem Glutamin, so wird das Protein nicht mehr exprimiert. Die mit dem Orai1N223Q Konstrukt transfizierten Zellen zeigen keinen I_{CRAC} und das Protein lässt sich biochemisch mittels Western Blot nicht nachweisen. Wahrscheinlich kann das Protein durch den Aminosäureaustausch nicht mehr korrekt gefaltet werden und wird direkt über das Proteasom wieder abgebaut. Der Verlust der Zuckerkette an Position N223 durch den Aminosäureaustausch N zu A (Asparagin zu Alanin) hat keinen Einfluss auf die Funktionalität des Orai1 Kanals, wenn man das Konstrukt in HEK293 Zellen untersucht. Die Calciumsignale weisen keine Unterschiede auf und die Calciumströme, sowie die Kanalleitfähigkeit verändern sich auch nicht. Dies widerspricht den Ergebnissen von Gwack et al. aus dem Jahr 2007. Die Gruppe untersuchte den Calciumeinstrom in SCID Fibroblasten und konnte mit der glykosylierungsdefizienten Orai1N223A Mutante einen erhöhten Calciumeinstrom detektieren (Gwack et al, 2007b). Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass Fibroblasten und HEK293 Zellen unterschiedliche Sets an zuckermodifizierenden Enzymen besitzen. Es ist möglich, dass sich mit der Orai1N223A Mutante in einem anderen Zellsystem ein Phänotyp zeigen würde. Es ist zudem vorstellbar, dass sich heteromultimere Kanäle aus glykosyliertem und unglykosyliertem Orai1 Protein hinsichtlich ihrer Eigenschaften von dem homomultimeren glykosylierten Orai1 Kanal unterscheiden. Die Konstrukte sollten deshalb noch mal in einem anderen Zellsystem mit wenig endogenem Orai1 Hintergrund und anderen zuckermodifizierenden Enzymen untersucht werden.

Die Glykosylierungsstellen des STIM1 Moleküls liegen in funktionellen Bereichen des Proteins. Die erste Seite N131 liegt innerhalb der SAM Domäne $\alpha 6$ Helix ($\alpha 6$) und die zweite Seite N171 am Anfang der kurzen SAM $\alpha 9$ Helix ($\alpha 9$). Stathopoulos et al. untersuchten die Struktur der EF-SAM Domäne genauer und fanden heraus, dass es zwischen bestimmten Aminosäuren innerhalb dieser Domänen hydrophobe Wechselwirkungen gibt. Diese Kräfte sind ausschlaggebend für die Faltung und Funktion des Calciumsensors und die anschließende Multimerisierung der STIM1 Moleküle. Kritische Aminosäureaustausche in dieser Region können zum Verlust der Calciumsensorfunktion und zur Multimerisierung der STIM1 Moleküle, unabhängig von der Calciumionenkonzentration im ER, führen. Interessanterweise wurden für diese Arbeit die W132R Mutation kloniert, welche keinen Einfluss auf die STIM1 Funktion hat, und die T172R Mutante welche konstitutiv aggregiert ist. Diese beiden Aminosäuren liegen in direkter Nachbarschaft zu den beiden Glykosylierungsstellen innerhalb des STIM1 Moleküls. Die STIM1N131QN171Q Mutante wurde bereits von Mignen et al. im Bezug auf die unterschiedliche Aktivierung des CRAC und des ARC Kanals untersucht. In deren Arbeit konnte keine unterschiedliche Stromdichte in den Zellen mit der glykosylierungsdefizienten STIM1 Mutante detektiert werden. Csutora et al. hingegen fanden eine deutliche Reduktion der Stromdichte nach Überexpression der glykosylierungsdefizienten STIM1QQ Mutante, was mit den in dieser Arbeit beschriebenen Daten übereinstimmt. In der vorliegenden Arbeit wurden an den beiden Glykosylierungsseiten unterschiedliche Aminosäureaustausche durchgeführt und die Auswirkungen auf die Calciumsignale untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Unterbindung der Glykosylierung *per se* nicht immer den gleichen Effekt hat.

Während das STIM1N131QN171Q (QQ) Protein einen verkleinerten I_{CRAC} vermittelt, konnte mit der STIM1N131DN171Q (DQ) eine starke gain of function Mutante identifiziert werden, die I_{CRAC} um ein Vierfaches verstärkt.

Das STIM1DQ Protein vermittelt keinen konstitutiv aktiven Strom, ist aber in der Lage nach Speicherentleerung deutlich schneller zu clustern und den Strom somit schneller zu aktivieren. Auch die basale Calciumionenkonzentration in diesen Zellen ist signifikant erhöht und der Calciumgehalt des ER reduziert, was zusammen mit der schnelleren Aktivierungskinetik darauf hindeuten könnte, dass die EF-Hand das Ca^{2+} weniger affin bindet. Eine erhöhte basale Fluoreszenz in der TIRF Ebene kann darauf hinweisen, dass STIM1DQ Moleküle verstärkt in der Nähe der PM oder in der PM vorliegen, was durch eine geringere Calciumaffinität der EF-Hand zu erklären wäre. Der STIM1DQ Phänotyp lässt sich nicht alleine durch die fehlende Glykosylierung an den Positionen N131 und N171 erklären, da keine der anderen untersuchten glykosylierungsdefizienten STIM1 Mutanten einen ähnlichen Phänotyp aufweist. Wahrscheinlich führen die speziellen Aminosäure-Substitutionen N131D und N171Q innerhalb der EF-SAM Domäne zu einer strukturellen Veränderung dieses Bereichs, die sich durch eine geringere Calciumionenaffinität der EF-Hand auszeichnet.

Interessanterweise konnte der STIM1DQ Phänotyp mit einer Reduktion der Orai1 Proteinmenge korreliert werden. Die Untersuchung der Menge von Orai1 Protein in der PM mit Hilfe von Biotinylierungsexperimenten zeigte, dass pro Orai1 Tetramer an der PM insgesamt viel mehr STIM1DQ Moleküle als STIM1WT Moleküle zur Aktivierung zur Verfügung stehen. Die nicht-stationäre Noise Analyse und die Untersuchung der Offenwahrscheinlichkeit unterstützen diese Daten und weisen darauf hin, dass die STIM1DQ Mutante deutlich mehr Orai1 Kanäle aktivieren kann, während die Einzelkanalleitfähigkeit und die Offenwahrscheinlichkeit nicht verändert sind. Insgesamt hat man weniger Orai1 Protein, aber mehr aktive Kanäle. Es ist bekannt, dass man die Stromdichte von I_{CRAC} in Jurakt T Zellen durch alleinige Überexpression von STIM1 erhöhen kann. Wird Orai1 hingegen alleine überexprimiert, so entwickelt sich der Strom nicht. Dies lässt sich durch eine zu starke "Verdünnung" des STIM1 Proteins erklären. Damit der Orai1 Kanal überhaupt aktiviert werden kann, müssen mindestens zwei STIM1 Moleküle an den Kanal binden (Hoover & Lewis, 2011, Li et al, 2011). Befinden sich nun in einer Zelle viel mehr Orai1 Proteine als STIM1 Proteine so sinkt die Wahrscheinlichkeit dafür, einen Orai1 Kanal mit mindestens zwei STIM1 Molekülen besetzen zu können. Die STIM1DQ Mutante reduziert somit zwar die Orai1 Proteinmenge im Gesamten, verbessert allerdings das STIM1 zu Orai1 Verhältnis, so dass mehr Kanäle mindestens zwei STIM1 Moleküle binden und somit aktiviert werden können. Das mathematische Modell, welches in Zusammenarbeit mit der Theoretischen Physik erstellt wurde, unterstützt diese Annahmen. Hier ist gezeigt, dass sich die Stromdichte des CRAC-Stroms durch die Anzahl der Orai1 Kanäle in den verschiedenen Besetzungszuständen beschreiben lässt. Je mehr Orai1 Tetramere mit 8 STIM1 Molekülen besetzt sind, umso größer ist die Stromdichte. Der STIM1DQ Phänotyp lässt sich im Modell durch ein verbessertes STIM1:Orai1 Verhältnis, zusammen mit einer erhöhten Clustergeschwindigkeit bzw. Membrandiffusion beschreiben. Diese theoretischen Ergebnisse passen sehr gut zu den gemessenen Werten.

Exprimiert man das STIM1DQ Protein zusammen mit Orai2 so wird der Strom auch hier amplifiziert, während der Orai3 vermittelte Strom nicht verstärkt werden kann. Wird der N-Terminus des Orai3 Moleküls durch den von Orai1 ersetzt (Orai1-Orai3-Chimere), so ist die STIM1DQ Mutante wiederum in der Lage die Stromdichte deutlich zu vergrößern. Auch jegliche Veränderungen des

C-Terms von STIM1DQ, wie z.B. STIM1DQFQ oder STIM1DQ Δ KK, führen zu einer starken Reduktion der Orai1 vermittelten Stromdichte. Diese Ergebnisse deuten auf eine veränderte Interaktion des STIM1DQ C-Terms mit dem N-Term von Orai1 hin.

Mit der STIM1FQ Mutante sollte das gesamte STIM1 Protein im ER reteniert werden, und die Funktion von STIM1 in der Plasmamembran untersucht werden. Der STIM1DQ Effekt ist in beiden Fällen, nach Anhängen des KKFQ-Signals, als auch nach Entfernung der N-Terminalen Lysine Δ KK, verschwunden. Allerdings reduziert die Entfernung der N-terminalen Lysine auch die STIM1WT vermittelten Ströme signifikant, wobei das KKFQ-Motif diese Ströme nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das STIM1DQ Molekül in der Plasmamembran eine Rolle bei der Aktivierung des CRAC Stroms haben könnte. Bereits im Jahr 2005 beschrieben Zhang et al. die Translokation von STIM1 in die PM nach Speicherentleerung (Zhang et al, 2005). Shuttleworth schreibt PM ständigem STIM1 die Aktivierung des ARC channels zu (Shuttleworth, 2012). Spasova et al. zeigten im Jahr 2006, dass der CRAC-Strom in Jurkat T-Zellen und HEK293 Zellen nach Inkubation mit einem Antikörper gegen STIM1 inhibiert wird. Diese Ergebnisse würden PM ständigem STIM1 eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung oder Aufrechterhaltung von I_{CRAC} zusprechen. Die Bedeutung von PM lokalisiertem STIM1 ist somit noch nicht aufgeklärt und sollte weiter untersucht werden.

7.3 Regulation der Orai1 und STIM1 Proteinmenge

Das STIM1 zu Orai1 Proteinverhältnis in der Zelle spielt eine wichtige Rolle für die Eigenschaften des CRAC Stroms. Sowohl die Stromdichte, als auch die Ca^{2+} abhängige Inaktivierung des Stroms, werden nicht bloß durch die absoluten Proteinmengen, sondern auch durch das STIM1 zu Orai1 Ratio vermittelt (Scrimgeour et al, 2009). Die Offenwahrscheinlichkeit des Orai1 Kanals in der PM ändert sich mit der Anzahl gebundener STIM1 Moleküle und bestimmt dadurch die Stromdichte (Hoover & Lewis, 2011, Li et al, 2011). Die Regulation des CRAC Stroms durch unterschiedliche Expression von STIM bzw. Orai spielt auch im nativen System eine Rolle. Luo et al. zeigten im Jahr 2011, dass das STIM1 Protein zwar in neonatalen, nicht aber in adulten Kardiomyozyten nachweisbar ist und, dass SOCE in diesen Zellen mit der Menge an STIM1 Protein korreliert werden kann. In vivo und in vitro Modelle für kardiale Hypertrophy weisen allerdings eine Reaktivierung der STIM1 Expression in diesen Zellen auf, welche so auch zur Vergrößerung von SOCE führt. Die Inhibition der STIM1 Expression verhindert die Agonist-induzierte Hypertrophy in diesem Modell (Luo et al, 2012b). Ein weiteres Beispiel für unterschiedliche STIM1 Expressionslevel und damit unterschiedlichen STIM1 zu Orai1 Verhältnissen in nativen Systemen stellen B- und T-Lymphozyten dar. Reife T-Zellen exprimieren bis zu viermal mehr STIM1 als reife B-Zellen und zeigen einen deutlich verstärkten SOCE (Yarkoni & Cambier, 2011). Diese Arbeiten zeigen, dass unterschiedliche Verhältnisse von STIM1 zu Orai1 auch im nativen System genutzt werden, um den Calciumeinstrom an die Funktion anzupassen und vor allem, dass sich das STIM1 zu Orai1 Verhältnis auch in Folge von Entwicklung oder Krankheit verändern oder angepasst werden kann. Demzufolge muss es eine Art gegenseitige Regulation bei der Expression/Degradation der beiden Proteine STIM1 und Orai1 geben.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression der STIM1DQ Mutante mit einer Reduktion der Orai1 Proteinmenge einhergeht. Diese Beobachtung bestätigt die Hypothese über eine gegenseitige Regulierung der Expression. Der genaue Mechanismus der Regulierung

konnte noch nicht eindeutig bestimmt werden, allerdings deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Regulierung nach der Translation stattfindet, da die Orai1 mRNA Mengen nach Kotransfektion mit STIM1WT und STIM1DQ nicht verschieden sind. Zudem kann ein Einfluss von ER-Stress oder verstärkter E3-Ligaseaktivität weitestgehend ausgeschlossen werden. Da nach Koexpression der STIM1DQ Konstrukte mit nicht funktionellen Orai1 Konstrukten (Orai1R91W) das basale Ca^{2+} in den Zellen erniedrigt ist und die Orai1 Proteindegradation nahezu nicht mehr nachzuweisen ist, ist davon auszugehen, dass es sich bei dem zugrunde liegenden Regulierungsmechanismus um einen Ca^{2+} -abhängigen Prozess handelt. Dieser wird dann in den Zellen, die mit STIM1DQ transfiziert sind, aufgrund des erhöhten basalen Ca^{2+} Levels, verstärkt induziert. Die mit Caspaseinhibitor V behandelten und STIM1DQ transfizierten Zellen weisen ebenfalls eine verringerte Orai1 Degradation und einen verringerten I_{CRAC} auf. Diese Ergebnisse sprechen für die Beteiligung von Caspase induzierten Prozessen bei der Regulation. In zukünftigen Experimenten könnte zunächst untersucht werden, ob STIM1 und Orai1 Caspaseschnittstellen besitzen, welche unter Umständen mutiert werden könnten. Zudem könnte man Caspaseaktivatoren, wie z.B. Pac-1, einsetzen um den STIM1DQ Phänotyp mit STIM1WT zu imitieren. Außerdem könnte man eine Caspase in Zellen überexprimieren und untersuchen, ob das STIM1WT Protein dann auch STIM1DQ ähnliche Ströme vermittelt. Denkbar wäre allerdings auch eine lokale Aktivität von Caspasen lediglich an Orten des Calciumioneneinstroms, d.h. direkt am aktiven Orai1 Kanal. Um dies zu untersuchen müsste man sich mittels TIRF Mikroskopie die ER-PM-Junctions anschauen, wo STIM1 und Orai1 nach Aktivierung zusammenlagern. Es wäre denkbar, dass in Zellen, die die STIM1DQ Mutante exprimieren, eine verstärkte Caspaseaktivität an jenen Orten festzustellen ist.

Das Vorhandensein einer gegenseitigen Regulation bei der Expression bzw. Degradation von STIM1 und Orai1 Protein ist nicht von der Hand zu weisen und spielt auch in nativen Systemen in der Entwicklung oder bei Krankheit eine wichtige Rolle. Die genauen Mechanismen die dieser Regulierung zugrunde liegen müssen allerdings noch genauer untersucht werden.

8 Anhang

8.1 Literaturverzeichnis

Baba Y & Kurosaki T (2009) Physiological function and molecular basis of STIM1-mediated calcium entry in immune cells. *Immunol Rev* **231**: 174-188

Badiola N, Penas C, Minano-Molina A, Barneda-Zahonero B, Fado R, Sanchez-Opazo G, Comella JX, Sabria J, Zhu C, Blomgren K, Casas C, & Rodriguez-Alvarez J (2011) Induction of ER stress in response to oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of the PERK and IRE-1 pathways and of caspase-12. *Cell Death Dis* **2**: e149

Bakowski D, Glitsch MD, & Parekh AB (2001) An examination of the secretion-like coupling model for the activation of the Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current $\text{I}(\text{CRAC})$ in RBL-1 cells. *J Physiol* **532**: 55-71

Berger SB, Sadighi Akha AA, Miller RA, & Garcia GG (2006) CD43-independent augmentation of mouse T-cell function by glycoprotein cleaving enzymes. *Immunology* **119**: 178-186

Berridge MJ (1993) Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature* **365**: 388-389

Berridge MJ, Lipp P, & Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 11-21

Blackshaw S, Sawa A, Sharp AH, Ross CA, Snyder SH, & Khan AA (2000) Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates cell death. *FASEB J* **14**: 1375-1379

Cahalan MD (2009) STIMulating store-operated Ca^{2+} entry. *Nat Cell Biol* **11**: 669-677

Cahalan MD & Chandy KG (2009) The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunol Rev* **231**: 59-87

- Carafoli E (2002) Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 1115-1122
- Cha SK, Ortega B, Kurosu H, Rosenblatt KP, Kuro-O M, & Huang CL (2008) Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 9805-9810
- Chen N, Garner AL, Chen G, Jing Y, Deng Y, Swanson RJ, Kolb JF, Beebe SJ, Joshi RP, & Schoenbach KH (2007) Nanosecond electric pulses penetrate the nucleus and enhance speckle formation. *Biochem Biophys Res Commun* **364**: 220-225
- Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* **131**: 1047-1058
- Clapham DE (1995) Calcium signaling. *Cell* **80**: 259-268
- Csutora P, Peter K, Kilic H, Park KM, Zarayskiy V, Gwozdz T, & Bolotina VM (2008) Novel role for STIM1 as a trigger for calcium influx factor production. *J Biol Chem* **283**: 14524-14531
- Derler I, Fahrner M, Muik M, Lackner B, Schindl R, Groschner K, & Romanin C (2009) A Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) modulatory domain (CMD) within STIM1 mediates fast Ca^{2+} -dependent inactivation of ORAI1 channels. *J Biol Chem* **284**: 24933-24938
- Endo M (2006) Obituary: Setsuro Ebashi (1922-2006). *Nature* **442**: 996
- Enfissi A, Prigent S, Colosetti P, & Capiod T (2004) The blocking of capacitative calcium entry by 2-aminoethyl diphenylborate (2-APB) and carboxyamidotriazole (CAI) inhibits proliferation in Hep G2 and Huh-7 human hepatoma cells. *Cell Calcium* **36**: 459-467
- Fasolato C, Innocenti B, & Pozzan T (1994) Receptor-activated Ca^{2+} influx: how many mechanisms for how many channels? *Trends Pharmacol Sci* **15**: 77-83

Feske S (2011) Immunodeficiency due to defects in store-operated calcium entry. *Ann N Y Acad Sci* **1238**: 74-90

Feske S (2007) Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol* **7**: 690-702

Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, & Rao A (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**: 179-185

Flourakis M, Lehen'kyi V, Beck B, Raphael M, Vandenberghe M, Abeele FV, Roudbaraki M, Lepage G, Mauroy B, Romanin C, Shuba Y, Skryma R, & Prevarskaya N (2010) Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell Death Dis* **1**: e75

Gill DL, Waldron RT, Rys-Sikora KE, Ufret-Vincenty CA, Graber MN, Favre CJ, & Alfonso A (1996) Calcium pools, calcium entry, and cell growth. *Biosci Rep* **16**: 139-157

Golovina VA, Platoshyn O, Bailey CL, Wang J, Limsuwan A, Sweeney M, Rubin LJ, & Yuan JX (2001) Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca^{2+} entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**: H746-55

Gwack Y, Feske S, Srikanth S, Hogan PG, & Rao A (2007a) Signalling to transcription: store-operated Ca^{2+} entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium* **42**: 145-156

Gwack Y, Srikanth S, Feske S, Cruz-Guilloty F, Oh-hora M, Neems DS, Hogan PG, & Rao A (2007b) Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *J Biol Chem* **282**: 16232-16243

- Gwack Y, Srikanth S, Oh-Hora M, Hogan PG, Lamperti ED, Yamashita M, Gelinas C, Neems DS, Sasaki Y, Feske S, Prakriya M, Rajewsky K, & Rao A (2008) Hair loss and defective T- and B-cell function in mice lacking ORAI1. *Mol Cell Biol* **28**: 5209-5222
- Helenius A & Aeby M (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**: 2364-2369
- Hermosura MC, Montielh-Zoller MK, Scharenberg AM, Penner R, & Fleig A (2002) Dissociation of the store-operated calcium current I(CRAC) and the Mg-nucleotide-regulated metal ion current MagNuM. *J Physiol* **539**: 445-458
- Hewavitharana T, Deng X, Wang Y, Ritchie MF, Girish GV, Soboloff J, & Gill DL (2008) Location and function of STIM1 in the activation of Ca²⁺ entry signals. *J Biol Chem* **283**: 26252-26262
- Hoover PJ & Lewis RS (2011) Stoichiometric requirements for trapping and gating of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels by stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 13299-13304
- Hoth M & Penner R (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* **355**: 353-356
- Hsu JL, Chiang PC, & Guh JH (2009) Tunicamycin induces resistance to camptothecin and etoposide in human hepatocellular carcinoma cells: role of cell-cycle arrest and GRP78. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **380**: 373-382
- Imperiali B & Hendrickson TL (1995) Asparagine-linked glycosylation: specificity and function of oligosaccharyl transferase. *Bioorg Med Chem* **3**: 1565-1578
- Kim JY & Muallem S (2011) Unlocking SOAR releases STIM. *EMBO J* **30**: 1673-1675

- Kimlicka L & Van Petegem F (2011) The structural biology of ryanodine receptors. *Sci China Life Sci* **54**: 712-724
- Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, & Kuro-o M (2005) Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* **309**: 1829-1833
- Larsen MK, Berge KE, Leren TP, Nissen PH, Hansen J, Kristensen IB, Banner J, & Jensen HK (2012) Postmortem genetic testing of the ryanodine receptor 2 (RYR2) gene in a cohort of sudden unexplained death cases. *Int J Legal Med*
- Lauritzen E & Pluskal M (1988) Improved HIV antiglycoprotein antibody detection by immunoblotting on a hydrophobic membrane. *J Acquir Immune Defic Syndr* **1**: 333-339
- Li Z, Liu L, Deng Y, Ji W, Du W, Xu P, Chen L, & Xu T (2011) Graded activation of CRAC channel by binding of different numbers of STIM1 to Orai1 subunits. *Cell Res* **21**: 305-315
- Li Z, Lu J, Xu P, Xie X, Chen L, & Xu T (2007) Mapping the interacting domains of STIM1 and Orai1 in Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activation. *J Biol Chem* **282**: 29448-29456
- Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, Jr, & Meyer T (2005) STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. *Curr Biol* **15**: 1235-1241
- Lioudyno MI, Kozak JA, Penna A, Safrina O, Zhang SL, Sen D, Roos J, Stauderman KA, & Cahalan MD (2008) Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 2011-2016

- Lis A, Peinelt C, Beck A, Parvez S, Monteilh-Zoller M, Fleig A, & Penner R (2007) CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca^{2+} channels with distinct functional properties. *Curr Biol* **17**: 794-800
- Lis A, Zierler S, Peinelt C, Fleig A, & Penner R (2010) A single lysine in the N-terminal region of store-operated channels is critical for STIM1-mediated gating. *J Gen Physiol* **136**: 673-686
- Luo X, Hojaye B, Jiang N, Wang ZV, Tandan S, Rakalin A, Rothermel BA, Gillette TG, & Hill JA (2012a) STIM1-dependent store-operated Ca^{2+} entry is required for pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* **52**: 136-147
- Luo X, Hojaye B, Jiang N, Wang ZV, Tandan S, Rakalin A, Rothermel BA, Gillette TG, & Hill JA (2012b) STIM1-dependent store-operated Ca^{2+} entry is required for pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* **52**: 136-147
- Mak DO, McBride S, & Foskett JK (1999) ATP regulation of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel gating by allosteric tuning of Ca^{2+} activation. *J Biol Chem* **274**: 22231-22237
- Marth JD & Grewal PK (2008) Mammalian glycosylation in immunity. *Nat Rev Immunol* **8**: 874-887
- Means S, Smith AJ, Shepherd J, Shadid J, Fowler J, Wojcikiewicz RJ, Mazel T, Smith GD, & Wilson BS (2006) Reaction diffusion modeling of calcium dynamics with realistic ER geometry. *Biophys J* **91**: 537-557
- Mignen O, Thompson JL, & Shuttleworth TJ (2007) STIM1 regulates Ca^{2+} entry via arachidonate-regulated Ca^{2+} -selective (ARC) channels without store depletion or translocation to the plasma membrane. *J Physiol* **579**: 703-715

- Mikoshiha K (2011) Role of IP receptor in development. *Cell Calcium* **49**: 331-340
- Morgulis S & Gies WJ (1914) The Calcium Content in Bones and Teeth from Normal and Thymectomized Albino Rats. *J Exp Med* **20**: 499-502
- Mullins FM, Park CY, Dolmetsch RE, & Lewis RS (2009) STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 15495-15500
- Ohana L, Newell EW, Stanley EF, & Schlichter LC (2009) The Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current (I(CRAC)) mediates store-operated Ca²⁺ entry in rat microglia. *Channels (Austin)* **3**: 129-139
- Oh-hora M (2009) Calcium signaling in the development and function of T-lineage cells. *Immunol Rev* **231**: 210-224
- Oritani K & Kincade PW (1996) Identification of stromal cell products that interact with pre-B cells. *J Cell Biol* **134**: 771-782
- Pani B, Ong HL, Brazer SC, Liu X, Rauser K, Singh BB, & Ambudkar IS (2009) Activation of TRPC1 by STIM1 in ER-PM microdomains involves release of the channel from its scaffold caveolin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 20087-20092
- Parekh AB, Fleig A, & Penner R (1997) The store-operated calcium current I(CRAC): nonlinear activation by InsP₃ and dissociation from calcium release. *Cell* **89**: 973-980
- Parekh AB & Putney JW, Jr (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* **85**: 757-810
- Park CY, Hoover PJ, Mullins FM, Bachhawat P, Covington ED, Raunser S, Walz T, Garcia KC, Dolmetsch RE, & Lewis RS (2009) STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* **136**: 876-890

- Park WH & Kim SH (2012) MG132, a proteasome inhibitor, induces human pulmonary fibroblast cell death via increasing ROS levels and GSH depletion. *Oncol Rep*
- Peinelt C, Lis A, Beck A, Fleig A, & Penner R (2008a) 2-Aminoethoxydiphenyl borate directly facilitates and indirectly inhibits STIM1-dependent gating of CRAC channels. *J Physiol* **586**: 3061-3073
- Peinelt C, Lis A, Beck A, Fleig A, & Penner R (2008b) 2-Aminoethoxydiphenyl borate directly facilitates and indirectly inhibits STIM1-dependent gating of CRAC channels. *J Physiol* **586**: 3061-3073
- Peinelt C, Vig M, Koomoa DL, Beck A, Nadler MJ, Koblan-Huberson M, Lis A, Fleig A, Penner R, & Kinet JP (2006) Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol* **8**: 771-773
- Penna A, Demuro A, Yeromin AV, Zhang SL, Safrina O, Parker I, & Cahalan MD (2008) The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* **456**: 116-120
- Picard C, McCarl CA, Papolos A, Khalil S, Luthy K, Hivroz C, LeDeist F, Rieux-Laucat F, Rechavi G, Rao A, Fischer A, & Feske S (2009) STIM1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity. *N Engl J Med* **360**: 1971-1980
- Plackett TP, Boehmer ED, Faunce DE, & Kovacs EJ (2004) Aging and innate immune cells. *J Leukoc Biol* **76**: 291-299
- Prakriya M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A, & Hogan PG (2006) Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* **443**: 230-233
- Putney JW, Jr & Bird GS (1993) The signal for capacitative calcium entry. *Cell* **75**: 199-201

Quintana A, Pasche M, Junker C, Al-Ansary D, Rieger H, Kummerow C, Nunez L, Villalobos C, Meraner P, Becherer U, Rettig J, Niemeyer BA, & Hoth M (2011) Calcium microdomains at the immunological synapse: how ORAI channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation. *EMBO J* **30**: 3895-3912

Ray K, Clapp P, Goldsmith PK, & Spiegel AM (1998) Identification of the sites of N-linked glycosylation on the human calcium receptor and assessment of their role in cell surface expression and signal transduction. *J Biol Chem* **273**: 34558-34567

Riley RL, Blomberg BB, & Frasca D (2005) B cells, E2A, and aging. *Immunol Rev* **205**: 30-47

Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velicelebi G, & Stauderman KA (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol* **169**: 435-445

Sabbioni S, Barbanti-Brodano G, Croce CM, & Negrini M (1997) GOK: a gene at 11p15 involved in rhabdomyosarcoma and rhabdoid tumor development. *Cancer Res* **57**: 4493-4497

Scrimgeour N, Litjens T, Ma L, Barritt GJ, & Rychkov GY (2009) Properties of Orai1 mediated store-operated current depend on the expression levels of STIM1 and Orai1 proteins. *J Physiol* **587**: 2903-2918

Shuttleworth TJ (2012) STIM and Orai proteins and the non-capacitative ARC channels. *Front Biosci* **17**: 847-860

Shuttleworth TJ, Thompson JL, & Mignen O (2007) STIM1 and the noncapacitative ARC channels. *Cell Calcium* **42**: 183-191

Smyth JT, Petranka JG, Boyles RR, DeHaven WI, Fukushima M, Johnson KL, Williams JG, & Putney JW, Jr (2009) Phosphorylation of STIM1 underlies suppression of store-operated calcium entry during mitosis. *Nat Cell Biol* **11**: 1465-1472

Soboloff J, Madesh M, & Gill DL (2011) Sensing cellular stress through STIM proteins. *Nat Chem Biol* **7**: 488-492

Soboloff J, Spassova MA, Tang XD, Hewavitharana T, Xu W, & Gill DL (2006) Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem* **281**: 20661-20665

Spassova MA, Soboloff J, He LP, Xu W, Dziadek MA, & Gill DL (2006) STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca(2+) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 4040-4045

Stanisz H, Stark A, Kilch T, Schwarz EC, Muller CS, Peinelt C, Hoth M, Niemeyer BA, Vogt T, & Bogeski I (2012) ORAI1 Ca(2+) Channels Control Endothelin-1-Induced Mitogenesis and Melanogenesis in Primary Human Melanocytes. *J Invest Dermatol*

Suyama K, Watanabe M, Sakabe K, Okada Y, Matsuyama D, Kuroiwa M, & Mochida J (2011) Overexpression of GRP78 protects glial cells from endoplasmic reticulum stress. *Neurosci Lett* **504**: 271-276

Tani D, Monteilh-Zoller MK, Fleig A, & Penner R (2007) Cell cycle-dependent regulation of store-operated I(CRAC) and Mg2+-nucleotide-regulated MagNuM (TRPM7) currents. *Cell Calcium* **41**: 249-260

- Thakur P & Fomina AF (2011) Density of functional Ca (2+) release-activated Ca (2+) (CRAC) channels declines after T cell activation. *Channels (Austin)* **5**
- Vanden Abeele F, Shuba Y, Roudbaraki M, Lemonnier L, Vanoverberghe K, Mariot P, Skryma R, & Prevarskaya N (2003) Store-operated Ca²⁺ channels in prostate cancer epithelial cells: function, regulation, and role in carcinogenesis. *Cell Calcium* **33**: 357-373
- Varnai P, Hunyady L, & Balla T (2009) STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. *Trends Pharmacol Sci* **30**: 118-128
- Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R, & Kinet JP (2006) CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science* **312**: 1220-1223
- Williams RT, Manji SS, Parker NJ, Hancock MS, Van Stekelenburg L, Eid JP, Senior PV, Kazenwadel JS, Shandala T, Saint R, Smith PJ, & Dziadek MA (2001) Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem J* **357**: 673-685
- Williams RT, Senior PV, Van Stekelenburg L, Layton JE, Smith PJ, & Dziadek MA (2002) Stromal interaction molecule 1 (STIM1), a transmembrane protein with growth suppressor activity, contains an extracellular SAM domain modified by N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta* **1596**: 131-137
- Wu X, Zagranichnaya TK, Gurda GT, Eves EM, & Villereal ML (2004) A TRPC1/TRPC3-mediated increase in store-operated calcium entry is required for differentiation of H19-7 hippocampal neuronal cells. *J Biol Chem* **279**: 43392-43402
- Xu C, Bailly-Maitre B, & Reed JC (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* **115**: 2656-2664

- Yamashita M, Somasundaram A, & Prakriya M (2011) Competitive modulation of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel gating by STIM1 and 2-aminoethyldiphenyl borate. *J Biol Chem* **286**: 9429-9442
- Yang B, Gwozdz T, Dutko-Gwozdz J, & Bolotina VM (2011) Orai1 and Ca^{2+} -independent phospholipase A2 are required for store-operated I_{catSOC} current, Ca^{2+} entry and proliferation of primary vascular smooth muscle cell. *Am J Physiol Cell Physiol*
- Yarkoni Y & Cambier JC (2011) Differential STIM1 expression in T and B cell subsets suggests a role in determining antigen receptor signal amplitude. *Mol Immunol* **48**: 1851-1858
- Zeng W, Yuan JP, Kim MS, Choi YJ, Huang GN, Worley PF, & Muallem S (2008) STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction. *Mol Cell* **32**: 439-448
- Zhang SL, Yeromin AV, Zhang XH, Yu Y, Safrina O, Penna A, Roos J, Stauderman KA, & Cahalan MD (2006) Genome-wide RNAi screen of Ca^{2+} influx identifies genes that regulate Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 9357-9362
- Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA, & Cahalan MD (2005) STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. *Nature* **437**: 902-905
- Zheng L, Stathopoulos PB, Schindl R, Li GY, Romanin C, & Ikura M (2011) Auto-inhibitory role of the EF-SAM domain of STIM proteins in store-operated calcium entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 1337-1342

Zhou Y, Meraner P, Kwon HT, Machnes D, Oh-hora M, Zimmer J, Huang Y, Stura A, Rao A, & Hogan PG (2010) STIM1 gates the store-operated calcium channel ORAI1 in vitro. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 112-116

Zou H, Lifshitz LM, Tuft RA, Fogarty KE, & Singer JJ (2002) Visualization of Ca²⁺ entry through single stretch-activated cation channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 6404-6409

Zweifach A & Lewis RS (1995) Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (ICRAC) due to local calcium feedback. *J Gen Physiol* **105**: 209-226

8.2 Unbedenklichkeitserklärung der Ethikkommission

In dieser Arbeit wurden Leukozyten-Reduktions-Kammern von Thrombozytenspendern zur Aufreinigung der T-Zellen verwendet. Dieses Vorgehen wurde von der Ethikkommission begutachtet und gestattet (Unbedenklichkeitserklärung vom 05.04.2005, Prof. Schie/Gn).

8.3 Eidesstattliche Erklärung

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4. Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich/entgeltlich geholfen:

1. Dr. Dalia Al Ansary hat die Orail stabilen HEK293 Zelllinien hergestellt. Zudem hat sie einige der verwendeten DNA-Konstrukte (z.B. STIM1-CD4-Chimere) kloniert und die Biotinylierungsexperimente (siehe Abbildung 18) durchgeführt.
2. Gertrud Schwär hat die qRT-PCR (siehe Abbildung 34, Abbildung 35, Abbildung 44) nach Rücksprache mit mir und nach meiner Anweisung experimentell durchgeführt.
3. Erstellung eines mathematischen Modells (siehe 6.17) in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Heiko Rieger (Theoretische Physik, Universität des Saarlandes, Saarbrücken)

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe. Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Homburg, im Mai 2012

8.4 Danksagungen

Mit großem Stolz und großer Freude habe ich gerade die letzten Buchstaben in die Datei meiner Dissertation getippt. Allerdings habe ich bei all der Freude nicht aus den Augen verloren, dass mir diese Ehre nicht zuteil hätte werden können, wenn mich nicht eine Vielzahl von Menschen auf meinem Weg begleitet und unterstützt hätte. Daher möchte ich diese Gelegenheit nutzen, um meinen tiefen Dank zum Ausdruck zu bringen.

Zunächst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Dr. Christine Peinelt und meiner Betreuerin Dr. Barbara Niemeyer von ganzem Herzen bedanken. Im gleichen Atemzug möchte ich hier Prof. Dr. Markus Hoth erwähnen. Ohne eure unerschöpfliche Ideenvielfalt und euer motivierendes und vorbildliches Engagement hätte ich meine Dissertation nicht so erfolgreich abschließen können. Eure Türen standen stets offen und eine bessere Betreuung kann sich ein Doktorand kaum wünschen. Danke!!!

Ein herzliches Dankeschön widme ich meinen Korrekturlesern Christine, Barbara, Eva, Jeanette und Reiner. Danke für die hilfreichen Kommentare, Anregungen und Kommata.

Dr. Dalia Al-Ansary möchte ich dafür danken, dass sie so ist, wie sie ist. Eine Aufzählung ihrer guten Taten würde den Rahmen dieser Danksagungen sprengen. Es ist schön, wenn Arbeitskollegen nicht nur Arbeitskollegen, sondern auch Freunde, sind.

Ein großes Dankeschön geht an meinen werten Arbeitskollegen und Freund, Zimmer- und Leidensgenossen Christian Holzmann. Danke für deinen technischen Support und deinen seelischen und moralischen Beistand in allen Situationen. Danke auch dafür, dass das Wort „Nein“ nicht in deinem Wortschatz existiert.

Ich möchte Andrea Armbrüster, Anja Ludes, Bettina Strauß, Gertrud Schwär und Sarah Leininger für die exzellente Unterstützung in den letzten Jahren danken. Ihr habt mir viel beigebracht und meinen Laboralltag leichter gemacht. Danke dafür!

Danke auch an die Postdoc Fraktion, bestehend aus Carsten Kummerow und Ivan Bogeski, für eure Hilfe und Unterstützung und für die gute Laune.

Auch bei allen anderen, jetzt nicht namentlich genannten, Mitarbeitern aus der Biophysik möchte ich mich herzlichst bedanken. Euch allen habe ich es zu verdanken, dass ich eine großartige Zeit in Homburg verbracht habe. Ich habe mich immer sehr, sehr wohl bei euch gefühlt und werde mich immer wieder gerne an diese Zeit zurück erinnern. Ihr seid spitze!

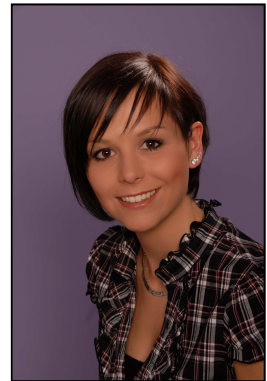
Last but not least möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Schwester Lisa, meinen Eltern Anette und Detlef und meinem Freund Domenico bedanken. Danke für eure Unterstützung und für all das wofür hier zu wenig Platz ist. Ich liebe euch!

8.5 Curriculum vitae

Tatiana Kilch

Persönliche Daten

Anschrift: Mühlenstraße 45
66578 Schiffweiler
Deutschland
e-mail: Tatiana.kilch@gmx.net
Geb.-Datum: 28. Mai 1984
Geb.-Ort: Neunkirchen/Saar
Nationalität: deutsch
Geschlecht: weiblich
Familienstand: ledig



Ausbildung

10/2008 – 02/2012 Universität des Saarlandes, Deutschland, Doktorand, Institut für Biophysik,
Dr. Christine Peinelt

Thema: „Bedeutung von N-Glykosylierungsmotiven für die Funktion des
speichergesteuerten Calcium Einstroms“

11/2010 - 02/2011 Universität von Adelaide, School of Medical Sciences, South Australia, For-
schungsaufenthalt, Prof. Dr. Grigori Rychkov

08/2008 - 09/2008 Universität des Saarlandes, Deutschland, Hilfwissenschaftler (HiWi), Prof.
Dr. Marc Freichel

08/2008 Diplom (Masters) der Biologie
Hauptfächer:
Pharmakologie (Dr. Oberwinkler)
Physiologie (Prof. Dr. Hoth/ PD Dr. Krause)
Virologie (Prof. Dr. Graesser, Prof. Dr. Meyerhans, Dr. med. Ruprecht)

11/2007 - 08/2008 Universität des Saarlandes, Deutschland, Diplomarbeit (Masters, thesis
work),
Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Prof. Dr. Marc Freichel

Thema: „Etablierung von mikrofluorometrischen Calcium-
Konzentrationsbestimmungen an Myozyten aus Widerstandsgefäßen und
Analyse von Aortenringkontraktionen an TRPC-defizienten Mäusen“

10/2003 - 08/2008 Universität des Saarlandes, Deutschland, Student der Human- und Molekularbiologie (Diplom / Masters)

08/1995 - 07/2003 Gymnasium Ottweiler, Deutschland, Abitur (university-entrance diploma)

Hauptfächer:

Biologie

Chemie

Italienisch

Publikationen

Tatiana Kilch (2008) **Etablierung von mikrofluorometrischen Calcium-Konzentrationsbestimmungen an Myozyten aus Widerstandsgefäßen und Analyse von Aortenringkontraktionen an TRPC-defizienten Mäusen**, Diplomarbeit zur Erlangung des akademischen Grades eines Diplom-Biologen, Universität des Saarlandes, Saarbrücken

Hedwig Stanisiz, Alexandra Stark, **Tatiana Kilch**, Eva C. Schwarz, Cornelia S.L. Müller, Christine Peinelt, Markus Hoth, Barbara A. Niemeyer, Thomas Vogt and Ivan Bogeski (2012) **Orai1 Ca^{2+} Channels Control Endothelin-1-Induced Mitogenesis and Melanogenesis in Primary Human Melanocytes**, Journal of Investigative Dermatology

Ivan Bogeski, **Tatiana Kilch**, Barbara A. Niemeyer (2012) **ROS and SOCE: Recent advances and controversies in the regulation of STIM and Orai**, Journal of Physiology

Tatiana Kilch, Dalia Al-Ansary, Grigori Rychkov, Christine Peinelt and Barbara A. Niemeyer (2012) **STIM1 SAM domain mutants regulate CRAC through altered oligomerization and destabilization of Orai1**; submitted

Dalia Al-Ansary, **Tatiana Kilch**, Christian Holzmann, Christine Peinelt, Markus Hoth and Anette Lis (2012) **How to measure I_{CRAC} and ORAI channel activity with patch-clamp and imaging**; Cold spring harbour protocols, under revision

Konferenzbeiträge

Tatiana Kilch, Dalia Al-Ansary, Kathrin Dörr, Christine Peinelt and Barbara A. Niemeyer (2011) **STIM1 glycosylation mutants regulate CRAC by modifying Orai protein stability and interaction**, SFB894/MCBO/GK1326 Joint Meeting 2011, Homburg, Deutschland

Tatiana Kilch, Dalia Al-Ansary, Grigori Rychkov, Christine Peinelt and Barbara A. Niemeyer (2012) **STIM mutants modify CRAC by altering Orai protein concentration**, 56. Biophysical Society meeting 2012, San Diego, California, USA

Tatiana Kilch, Dalia Al-Ansary, Grigori Rychkov, Christine Peinelt and Barbara A. Niemeyer (2012) **STIM mutants modify CRAC by altering Orai protein concentration**, 91. Deutsche Physiologentagung 2012, Dresden, Deutschland

Hedwig Stanisiz, **Tatiana Kilch**, Alexandra Stark, Cornelia S.L. Müller, Eva C. Schwarz, Christine Peinelt, Markus Hoth, Barbara A. Niemeyer, Thomas Vogt and Ivan Bogeski (2012) **Orai1 Ca²⁺ Channels regulate mitogenesis and melanogenesis in human melanocytes**, 91. Deutsche Physiologentagung 2012, Dresden, Germany